

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000282

International filing date: 31 January 2005 (31.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0010432
Filing date: 17 February 2004 (17.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 April 2005 (20.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0010432 호
Application Number 10-2004-0010432

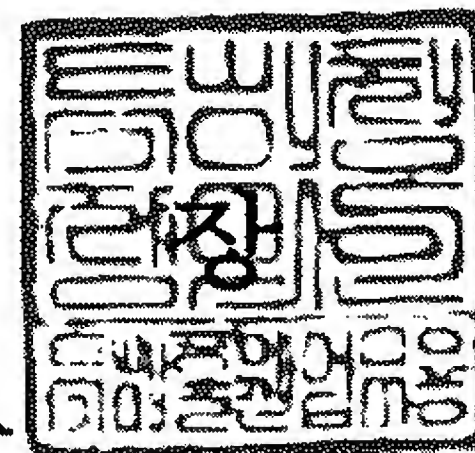
출 원 년 월 일 : 2004년 02월 17일
Date of Application FEB 17, 2004

출 원 인 : 동부한농화학 주식회사
Applicant(s) Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd.

2005 년 3 월 24 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허 출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.17
【발명의 명칭】	열매 및 종자 발달 조절용 유전자
【발명의 영문명칭】	Fruit and seed development regulating gene
【출원인】	
【명칭】	동부한농화학 주식회사
【출원인코드】	1-1998-000857-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-020567-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성순기
【성명의 영문표기】	SUNG,S00N-KEE
【주민등록번호】	620301-1896313
【우편번호】	427-801
【주소】	경기도 과천시 별양동 7번지 17통5반 407-1307
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영표
【성명의 영문표기】	LEE,Young-PY0
【주민등록번호】	740303-1221121
【우편번호】	305-728
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 101동 808호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유경희
【성명의 영문표기】	YU,GYUNG-HEE
【주민등록번호】	620710-2030130

【우편번호】	427-801
【주소】	경기도 과천시 별양동 7번지 17통 5반 407-1307
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최연옥
【성명의 영문표기】	CHOI, YEON-OK
【주민등록번호】	711122-1260612
【우편번호】	305-728
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 103동 106호
【국적】	KR
【우선권 주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2004-0006551
【출원일자】	2004.02.02
【증명서류】	첨부
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2003.08.01
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】	KCTC10588BP
【수탁일자】	2004.01.30
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】	KCTC10589BP
【수탁일자】	2004.01.30
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	20
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 61 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 11 항 461,000 원

【합계】 525,000 원

【첨부서류】

1. 미생물기탁증명서_2통 2. 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 열매 및 종자 발달 조절용 유전자에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 열매 및 종자 발달 조절용 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터를 형질도입한 형질전환 식물 세포, 상기 식물세포를 이용하여 제조한 열매발달 및 종자발달 억제용 또는 촉진용 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체의 생산방법 및 상기 유전자를 유효성분으로 포함하는 열매발달 및 종자발달 억제제 또는 촉진제에 관한 것이다. 열매 및 종자 발달을 조절할 수 있는 본 발명의 유전자를 이용하면 종자나 과일의 생육을 조절할 수 있어 종자 및 과일 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 19

【명세서】

【발명의 명칭】

열매 및 종자 발달 조절용 유전자{Fruit and seed development regulating gene}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 MADS-박스 및 K-도메인을 코딩하는 염기서열을 포함하는 MdMADS14 유전자의 염기 서열 및 이로부터 코딩되는 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 MADS-박스 및 K-도메인을 코딩하는 염기서열을 포함하는 MdMADS16 유전자의 염기 서열 및 이로부터 코딩되는 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자로부터 코딩되는 아미노산 서열의 상동성을 나타낸 것이다.

도 4는 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자로부터 코딩되는 아미노산 서열을 바탕으로 다른 MADS-박스 유전자군들과의 계통도 (phylogenetic tree)를 통해 상대적 관련 정도를 나타낸 것이다.

도 5는 MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자의 기관 및 열매발달 단계별 발현량을 비교정량한 실시간 PCR 분석 결과이다.

A: 사과 잎의 PCR 결과,

B: 사과 어린 꽃눈의 PCR 결과,

C: 사과 성숙한 꽃의 PCR 결과,

D: 사과 어린열매의 PCR 결과,

E: 사과 성숙열매의 PCR 결과,

F: PCR 반응에서의 녹는점 곡선 분석 (melting curve analysis)을 통한 각 반응 생성물의 녹는점 온도 그래프,

G: 그래프 A 내지 E의 결과를 기준으로 한 MdMADS14 유전자의 각 기관 및 발달 단계별 발현양상 그래프,

H: 그래프 A 내지 E의 결과를 기준으로 한 MdMADS16 유전자의 각 기관 및 발달 단계별 발현양상 그래프.

도 6은 MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자의 기관 및 열매발달 단계별 발현 양을 RT-PCR 수행한 후 PCR-서던블랏 분석하여 비교정량한 것이다.

도 7은 사과 꽃기관 및 열매 발달 과정에서 MdMADS16 유전자의 mRNA 발현 양상을 정위치 혼성분석 (in situ hybridization) 방법을 통해 분석한 결과이다.

A: 화기분열조직이 생성되었을 때의 어린 꽃눈,

B: 화원기를 가지고 있고 꽃기관의 분화가 일어나기 시작했을때의 어린 꽃눈,

C: 꽃기관의 분화가 진행되고 있을때의 꽃눈,

D: 수분후 7 내지 10일후의 미성숙 열매.

도 8은 식물체에 재조합 pMdMADS14 플라스미드가 도입되었음을 확인하기 위하여 형질전환체의 게놈 DNA를 대상으로 *NPTII* 유전자를 PCR로 증폭한 결과이다.

레인 1: 비형질전환체,

레인 2: MdMADS14 유전자 억제 형질전환체,

레인 3: MdMADS14 유전자 과발현 형질전환체 1,

레인 4: MdMADS14 유전자 과발현 형질전환체 2,

레인 5: MdMADS14 유전자 과발현 형질전환체 3.

도 9a 내지 도 9c는 MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체의 표현형 분석결과이다. 도 9a는 형질전환체와 비형질전환체의 전체적인 외형 사진이고, 도 9b는 수분전의 꽃과 심피부분을 조직학적으로 관찰한 사진이며, 도 9c는 수분 후의 단계의 초기 열매와 배주 부분을 조직학적으로 관찰한 사진이다.

도 10은 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 1과 비형질전환체의 외형 사진 (상단) 및 형질전환체 1과 비형질전환체의 열매안에서 종자가 발아되는 사진 (하단) 이다.

도 11은 후숙이 비형질전환체에 비해 늦어진, MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 1의 T1세대 열매 사진이다.

도 12는 도 11에 도식된 형질전환체 1과 비형질전환체의 종자를 수확하여 같은 조건에서 5일간 배양 후 발아율을 비교한 사진이다.

도 13은 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 1 및 비형질전환체의 종자 발아를 비교한 그래프이다.

도 14는 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 2와 비형질전환체의 열매 비교 사진이다. 좌측은 식물체 전체 사진이고, 우측은 이의 절단면이다.

도 15는 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 3과 비형질전환체의 발달단계 별 비교 사진이다.

도 16은 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 3과 TM29 유전자가 억제된 형질전환체의 표현형과 심피의 조직학적 관찰 사진이다.

도 17은 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 3에서 TM29 유전자의 발현정도를 비형질전환체와 비교 분석한 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 18은 MdMADS16 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체와 비형질전환체의 표현형을 나타낸 전체적인 외형사진 (상단) 및 열매부위를 확대한 사진 (하단) 이다.

도 19는 MdMADS16 유전자가 과발현된 형질전환체와 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 1이 모두 열매 안에서 종자가 일찍 발아됨을 확인한 표현형이 일치함을 나타내는 사진이다.

도 20은 MdMADS16 유전자가 과발현된 형질전환체와 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 2가 모두 꽃받침이 과육으로 변화되는 열매발달 초기, 중기 및 후기의 표현형이 일치함을 나타내는 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<36> 본 발명은 열매 및 종자 발달 조절용 유전자에 관한 것으로 보다 구체적으로는 사과로부터 분리한 열매 및 종자 발달 조절용 유전자에 관한 것이다.

<37> 식물의 꽃은 꽃받침, 꽃잎, 수술, 암술로 이루어져 있으며 이들은 화기 분열 조직의 발달에 의해 형성된다. 이 과정에서 각 기관형성에 필요한 유전자들은 A, B, C의 세가지 군으로 구분된다. 즉, A군 유전자는 꽃받침과 꽃잎의 발달을, B군 유전자

는 꽃잎과 수술의 발달을, C군 유전자는 수술과 암술의 발달을 담당하게 된다. 꽃기관 형성의 관점에서 다시 기술하면, 꽃받침은 A군 유전자의 작용에 의해, 꽃잎은 A군과 B군 유전자의 상호작용에 의해, 수술은 B군과 C군 유전자의 작용에 의해 각각 발달하게 된다. 꽃기관의 발달을 설명하는 이러한 모델을 ABC 모델이라 한다. 이 모델의 또 다른 특징은 A군과 C군 유전자는 서로 길항작용을 하고 있다는 것이다. 따라서, 세 군의 유전자 중에 하나가 문제가 생기면 그것이 관여하는 꽃기관이 비정상적으로 된다. 최근에는 D군의 유전자가 페튜니아 (petunia)에서 새롭게 분류되었으며, 이것이 배주 발달에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다 (G. C. Angenent *et al.*, *Plant Cell*, 1995, 7: 1569-1582).

<38>

MADS-박스 유전자는 MADS-박스라고 불리우는 보존된 영역을 가지는 전사인자 (transcription factor)를 코딩하는 30개 내지 그 이상의 아미노산 서열로 구성되는 유전자 패밀리를 나타낸다. 상기 유전자중 많은 것들은 전사 수준에서의 조절을 통하여 식물의 꽃 및 기타 여러 기관 분화에 관여한다고 알려져 있다. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 분류된 MADS-박스 유전자들 중에서 *APETALA1*(AP1) 및 *APETALA2*(AP2)는 A군의 유전자로 밝혀진바 있고, *APETALA*(AP3)와 *PISTILL*(PI)는 B군 유전자, 그리고 *AGAMOUS*(AG) 유전자는 C군 유전자로 분류되어진 바 있다 (Günter Theissen *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 115-149). 그리고, *floral binding protein7*(FBP7),

floral binding protein11(FBP11)은 형질전환된 페튜니아에서 상호억제 (cosuppression) 작용에 의해 배주 발달에 영향을 주는 유전자로 밝혀짐으로서 새롭게 D군 유전자로 분류되었다 (G. C. Angenent *et al.*, *Plant Cell*, 1995, 7: 1569-1582).

<39>

일반적으로 MADS-박스 유전자가 열매발달에 미치는 영향에 대한 기능 분석은 미진한 상황이다. 그러나, 정확한 열매발달 기능을 알 수 없지만 열매에서 발현되는 MADS-박스 유전자들이 상당수 있다. 또한, 최근 들어 꽃발달 이외에 NO₃⁻에 의해 유도되는 뿌리 발달에도 관여하는 MADS-박스 유전자가 있다고 보고된 바 있다 (Hanma Zhang *et al*, *Science*, 1998, 279: 407-409).

<40>

과일은 씨가 성숙하는데 적합한 환경을 제공하고 성숙한 씨를 퍼트리는 역할을 하여 피자 식물에서 배 발달에 중요한 역할을 한다. 이러한 과일의 발달은 꽃이 피고 수정되어 시작되는데, 이것은 꽃속에 여러 가지 해부학적, 화학적 변화와 생장에 의해 일어난다. 수정이 일어나면 알세포 (egg cell)는 배 (embryo)가 되고 극핵 (polar nuclei)은 배젖 (endosperm)으로, 배주 (ovule)는 씨 (seed)로 발달된다. 이때 자방 (ovary)에서도 변화가 일어나는데 세포의 분화 및 생장, 저장 물질의 변화와 축적에 의해 과일이라는 특수한 조직으로 발달하게 된다. 그러나 과일 중에는 사과와 같이 자방 뿐 아니라 화탁 (receptacle)과 같은 꽃 기관의 일부가 관여하는 경우가 있는데 이와 같이 자방 이외의 부분이 관계하고 있는 과일을 위과 (Pseudocarpic fruit)라고 한다. 자방이 생장, 변화해서 과일로 되는 것은 난

세포가 수정한 후에 일어나는 것이 보통이지만 종자가 없는 과일에서는 난세포가 수정하도 종자는 발육하지 못하고 자방만이 발달한다. 이와 같이 종자가 없는 과일을 형성하는 것을 단위결실 (Parthenocarp)이라 하고, 이와 다른 일반적인 결실을 양성결실 (Sexocarp)이라 한다. 단위결실은 수분 과정이 없이 자방이 발달되거나 (감귤류, 바나나, 파인애플), 수분은 되는데 수정이 일어나지 않은 채로 과실의 생장이 일어난 경우 (몇 가지 난초과 식물), 또는 수정 후 배가 유산 (abortion)된 경우 (포도, 복숭아, 버찌)에 일어난다.

<41> 유전학적기법을 통한 식물의 기관 발달, 특히 꽃 기관의 발달 원리의 이해는 개화 촉진을 통한 작물의 생육기간의 단축, 열매 및 종자 생산 효율의 증가, 단위결실에 의한 과일 및 원예 작물 개발에 응용될 수 있기 때문에 그 산업적인 요구가 대단히 크다.

<42> 이에, 본 발명자들은 열매 및 종자 발달을 조절하는 신규한 유전자를 분리하고, 이 유전자를 형질도입한 형질전환 식물체가 단위결실과 형성 및 발아 효율을 증진시키는 종자 (GM 작물)를 생산함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<43> 본 발명의 목적은 열매 및 종자 발달 조절용 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터를 형질도입한 형질전환 식물 세포, 상기 식물 세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 열매발달 및 종자발달 억제용 또는 촉진용

형질전환 식물체 및 상기 유전자를 유효성분으로 함유하는 열매발달 및 종자 발달 억제제 또는 촉진제를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<44> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 열매 및 종자 발달 조절용 유전자를 제공한다.

<45> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

<46> 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 형질도입한 형질전환 식물 세포를 제공한다.

<47> 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물 세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 열매발달 및 종자발달 억제용 또는 촉진용 형질전환 식물체를 제공한다.

<48> 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

<49> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 유효성분으로 함유하는 열매발달 및 종자발달 억제제 또는 촉진제를 제공한다.

<50> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<51> 본 발명은 MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 열매 및 종자 발달 조절용 유전자를 제공한다.

<52> 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자는 'MdMADS14' 유전자로 명명되며, 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자는 'MdMADS16' 유전자로 명명된다. 상기 MdMADS16 유전자는 MdMADS14 유전자와 90% 내지 99%의 상동성을 갖는 유전자인 것이 바람직하다. 또한, 상기 MdMADS16 아미노산과 MdMADS14 아미노산은 약 84% 이상의 상동성을 갖는다.

<53> 본 발명의 MdMADS14 유전자는 단지 사과꽃에서 발현된다고만 알려져 있으며, 정확한 기능에 대해서는 밝혀진바 없다 (C.G. van der Linden *et al.*, *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 1025-1036). 또한, 본 발명의 또 다른 MdMADS16 유전자는 상동성 비교하는 프로그램에 따라 차이가 나지만 전체적으로는 MdMADS14 유전자와 비교하여 90% 내지 99%의 상동성을 가지는 염기서열을 나타내는 신규한 염기서열이다. 도 2에 도시된 바와 같이 MdMADS16 유전자 또한 242개의 아미노산으로 구성된 개방 해독 판독틀(open reading frame, ORF)을 코딩하는 유전자를 가지고 있어 상기 개방 해독 판독틀은 MdMADS14 유전자의 것과 크기가 같았고, MdMADS16 유전자도 아미노 말단 부위에 MADS-박스 영역을 가지고 있었다. 상기 두 유전자의 전체적인 아미노산 서열의 상동성은 88.4%이고, MADS-박스 부분의 두 유전자의 상동성은 98.3%이고, MADS-박스 부분을 제외한 부분에서의 상동성은 85% 이상이었다(도 3).

<54>

또한, 상기 MdMADS14 유전자 또는 MdMADS16 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 서열목록으로 구체적으로 제시하지는 않았지만, 당업자라면 상기 유전자의 서열을 손쉽게 알 수 있다. MdMADS16 유전자의 경우 MdMADS14 유전자의 MADS-박스 부분을 제외한 부분에서의 상동성이 85% 이상이었으며, 상기 유전자가 모두 같은 기능을 하기 때문에 상기 유전자와의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 본 발명의 유전자와 동일한 기능을 한다는 것은 자명하게 알 수 있다.

<55>

본 발명의 바람직한 실시예에서는 MdMADS14 유전자 또는 MdMADS16 유전자를 각각 토마토에 형질전환 시켜 상기 유전자가 어떠한 기능을 하는지 확인하였다. 그 결과, MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체는 두 개체에서 열매가 열리지 않는 공통된 표현형을 보였다. 또한, MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체는 모두 3개체에서 각기 다른 표현형이 나타났는데, 이를 형질전환체 1, 형질전환체 2, 형질전환체 3이라 명명했다. 형질전환체 1에서는 열매의 후숙은 늦어지는 반면 종자의 발달이 촉진되었고, 형질전환체 2에서는 꽃받침이 과육으로 전환되었다. 형질전환체 3에서는 꽃잎이 꽃받침으로 전환되어지는 표현형을 각기 보였다. 또한, 도 10 및 도 11에 도시된 바와 같이 형질전환체 1의 열매는 같은 시기의 비형질전환체보다 후숙이 늦어지고, 종자가 열매 안에서 발아되어지는 등 종자 발달이 촉진되는 표현형이 나타났는데, 이런 형질은 T0 세대 뿐만 아니라 T1 세대에서도 반복되어 나타난 것으로 보아 형질이 유전되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 MdMADS14 유전자는 열매와 종자발달에 관여할 것임을 알 수 있었다.

<56>

또한, MdMADS16 유전자를 미니토마토에 형질전환시켰다. MdMADS16 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체에서는 도 18에 도시된 바와 같이 MdMADS14유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체와 마찬가지로 수분 이후 열매가 열리지 않는 표현형을 보였다. 이를 통해 MdMADS14 유전자나 MdMADS16 유전자 발현을 억제시켰을 때는 공통적으로 열매가 열리지 않음을 볼 수 있었다. 또한, MdMADS16 유전자의 발현을 과발현시킨 형질전환 식물체에서는 2가지의 표현형이 나타났는데 이런 표현형들은 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체의 표현형과 일치하는 표현형이었다. 먼저, 도 19에 도시된 바와 같이 MdMADS16유전자를 과발현시킨 형질전환 식물에서는 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 1에서와 같이 열매 후숙이 늦어지는 반면 종자가 열매 안에서 발아되어지는 현상을 보이는 형질전환체를 얻을 수 있었다. 또한, 다른 MdMADS16 유전자의 과발현 형질전환 식물체에서도 도 20에 도시된 바와 같이 꽃받침이 과육으로 변하는 표현형을 볼 수 있었고, 이러한 표현형은 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 2의 표현형과 일치하는 것이었다.

<57>

따라서, 본 발명의 실시예를 통해 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자는 매우 상동성이 높은 유전자로서 같은 패밀리 구성원임이 확실히 되어지고, 형질전환체를 통해 분석되어지는 유전자의 기능 분석에서도 두 유전자가 열매발달 및 종자발달에 관여하는 유전자임을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사과로부터 분리한 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자는 기존의 MADS 박스 유전자에서 밝혀진 기능에서는 확인할 수 없는 열매발달 및 종자발달을 조절하는 신규한 기능을 하는 유전자임을 알 수 있다.

- <58> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- <59> 본 발명의 발현벡터에 포함되는 유전자는 MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 것이 바람직하다.
- <60> 상기 유전자를 삽입하기 위해 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현벡터이면 어느 것이든 무방하나, 본 발명에서는 MdMADS14 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pGA1530 벡터를 제공한다. pGA1530 벡터는 35S 프로모터와 T7 터미네이터를 가지고 있으며 선별 유전자로 *NPT II (neomycin phosphotransferase)* 유전자를 가지고 있어 카나마이신 저항성을 갖게 한다 (Stanton B. Gelvin *et al*, *Plant molecular Biology Manual*, 1988, A3:1-19).
- <61> 또한, 본 발명에서는 MdMADS16 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pCAMBIA 2301 벡터를 제공한다. pCAMBIA 2301 벡터는 35S 프로모터와 NOS (*nopaline synthase*) 터미네이터를 가지고 있으며 선별 유전자로 *NPT II (neomycin phosphotransferase)* 유전자를 가지고 있어 카나마이신 저항성을 갖게 한다.
- <62> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 MdMADS14 유전자를 pGA1530 벡터에 정방향 또는 역방향으로 삽입한 발현벡터를 제조하고, 이를 각각 'pMdMADS14' 및 'pMdMADS14-R'라 명명하였고, MdMADS16 유전자를 pCAMBIA 2301 벡터에 정방향 또는 역방향으로 삽입한 발현벡터를 제조하고, 이를 각각 'pMdMADS16' 및 'pMdMADS16-R'이라 명명하였다.

<63> 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 형질도입한 열매발달 및 종자 발달 억제용 또는 촉진용 형질전환 식물 세포를 제공한다.

<64> 본 발명의 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는한 특정한 형태로 특별히 제한되지는 않는다. 이들 세포는, 예를 들면, 배양된 세포 부유물, 원형질체 (protoplast), 잎분획 (leaf section) 및 캘러스 (callus)를 포함한다. 발현벡터는 폴리에틸렌 글리콜 방법, 일렉트로포레이션 (electroporation), 아그로박테리움 (Agrobacterium)에 의해 매개되는 전달 및 입자 충격 (particle bombardment)과 같은 공지의 방법에 의하여 식물 세포에 도입될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 발현벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물 세포로 전달시켰으며, 이때 아그로박테리움으로는 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404 (Hoekema, A. *et al.*, 1983, *Nature*, 303, 179-181)를 사용하였다. 본 발명의 발현벡터인 pMdMADS14와 pMdMADS16 발현벡터를 각각 도입한 아그로박테리움을 제조하고, pMdMADS14와 pMdMADS16 발현벡터를 도입한 아그로박테리움을 각각 'agrobacterium tumefaciens LBA4404/pMdMADS14' 및 'agrobacterium tumefaciens LBA4404/pMdMADS16'이라 명명하였으며, 이를 각각 2004년 1월 30일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호: pMdMADS14; KCTC 10588BP, pMdMADS16; KCTC 10589BP).

<65> 또한, 상기 발현벡터를 도입할 수 있는 식물로는 열매 또는 종자를 형성하는 모든 식물이 될 수 있으며, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수와 같은 식량작물류; 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박,

파, 양파, 당근과 같은 채소작물류; 인삼, 가시오가피, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채와 같은 특용작물; 사과나무, 배나무, 오렌지, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나와 같은 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립과 같은 화훼류; 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스와 같은 사료작물류; 목화와 같은 섬유작물류; 그리고 꽃 및 관목과 같은 다양한 장식식물로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 본 발명의 발현벡터를 도입할 수 있는 식물은 토마토인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 pMdMADS14 또는 pMdMADS16 발현벡터를 도입한 아그로박테리움을 각각 토마토 미니토마토의 자엽 절편과 함께 공동 배양함으로써, 본 발명의 발현벡터가 도입된 형질전환 토마토 자엽(세포)을 얻을 수 있었다.

<66> 또한, 본 발명은 상기 식물세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 열매 발달 및 종자발달 촉진용 또는 억제용 형질전환 식물체를 제공한다.

<67> 본 발명의 형질전환 식물을 얻기 위해 수행하는 조직배양을 통한 재분화는 일반적인 형질전환 식물체 제조 공정을 통해 수행하는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 본 발명의 발현벡터가 도입된 형질전환 토마토 자엽을 재분화 배지(regeneration medium; MS, IAA 1 μ M, 제아틴 10 μ M, 수크로즈 3%, 세포탁심(cefotaxime) 350 mg/ ℓ , 카나마이신 50 mg/ ℓ , 0.7% 아가)로 옮겨주어 계대배양하였다. 이때 자엽 절편에서 나오는 형질전환된 싹초를 다시 뿌리 유도 배지(rooting medium; 1/2 MS, IAA 1 μ M, 3% 수크로즈, 카나마이신 50 mg/ ℓ , 0.7% 아가)에서 뿌

리를 유도하면서 다시 한번 형질전환체를 선별하였다. 형질전환되지 않은 싌초는 색
 깔이 변하면서 세포괴사(necrosis)가 일어나는데 비하여 형질전환된 싌초는 뿌리를
 내리면서 정상적으로 성장하였다. 뿌리가 유도된 싌초는 순화과정을 거쳐 토양으로
 옮겼다. 이렇게 함으로써 배주발달이 되지 않아 열매 및 종자발달이 억제되는 표현
 형, 꽃받침이 과육으로 전환되고 단위결실과가 생성되는 표현형, 꽃잎이 꽃받침으로
 전환되고 단위결실과가 생성되는 표현형, 종자발달이 촉진 또는 후숙과정이 지연되는
 표현형을 나타내는 형질전환 토마토를 수득할 수 있었다. 상기와 같은 표현형을 나
 타내는 식물체는 단위결실과를 형성할 수 있으며, 종자 발달을 촉진시킬 수 있다.

<68> 따라서, 본 발명의 형질전환 식물은 열매 또는 종자를 형성하는 모든 식물이 될
 수 있으며, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 쌀, 귀리, 수수와 같은 식량작
 물류; 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파,
 당근과 같은 채소작물류; 인삼, 가시오가피, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우,
 들깨, 땅콩, 유채와 같은 특용작물; 사과나무, 배나무, 오렌지, 대추나무, 복숭아,
 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나와 같은 과수류; 장미, 글라디올러스,
 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립과 같은 화훼류; 라이그라스, 레드클로버, 오차
 드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스와 같은 사료작물류; 목화와 같은
 섬유작물류; 그리고 꽃 및 관목과 같은 다양한 장식식물로 구성된 군으로부터 선택
 되는 것이 바람직하다.

<69> 또한, 본 발명은

<70> 1) 열매 및 종자 발달 조절 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;

- <71> 2) 상기 발현벡터를 아그로박테리움에 도입하는 단계;
- <72> 3) 상기 아그로박테리움과 식물 세포를 공동배양하여 상기 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및
- <73> 4) 상기 형질전환된 식물 세포를 조직배양하여 재분화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 열매발달 및 종자발달 촉진용 또는 억제용 식물의 제조방법을 제공한다.
- <74> 본 발명의 제조 방법에 있어서, 단계 1의 열매 및 종자 발달 조절 유전자는 MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 것이 바람직하다. 상기 단계 1의 발현벡터는 일반적인 식물 형질전환용 발현벡터이면 어느 것이든 무방하나, MdMADS14 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pGA1530 벡터, MdMADS16 유전자를 삽입하기 위한 벡터로 식물 형질전환용 pCAMBIA 2301 벡터를 사용하는 것이 바람직하다.
- <75> 상기 단계 2에 있어서, 발현벡터를 도입하는 아그로박테리움은 재조합 유전자를 포함하는 형질전환 벡터를 식물세포로 도입시키기 위한 매개체로, 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404 (Hoekema, A. *et al.*, 1983, *Nature*, 303, 179-181)를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자 각각을 발현하는 벡터

를 형질도입한 아그로박테리움은 각각 'agrobacterium tumefaciens LBA4404/pMdMADS14' (수탁번호:KCTC 10588BP) 및 'agrobacterium tumefaciens LBA4404/pMdMADS16' (수탁번호:KCTC 10589BP)인 것이 더욱 바람직하다.

<76> 상기 단계 3에 있어서, 형질전환시킬 식물 세포는 열매 또는 종자를 형성하는 모든 식물이 될 수 있으며, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 쌀, 귀리, 수수와 같은 식량작물류; 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근과 같은 채소작물류; 인삼, 가시오가피, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채와 같은 특용작물; 사과나무, 배나무, 오렌지, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나와 같은 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립과 같은 화훼류; 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스와 같은 사료작물류; 목화와 같은 섬유작물류; 그리고 꽃 및 관목과 같은 다양한 장식식물로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

<77> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 유효성분으로 함유하는 종자발달 및 열매발달 억제제 또는 촉진제를 제공한다.

<78> 본 발명의 유전자는 종자발달 및 열매발달 과정을 조절할 수 있기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 종자발달 및 열매발달 억제제 또는 촉진제를 제조할 수 있다. 본 발명의 유전자는 임상투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 유전자는 실제 임상투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용

하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용 될 수 있다.

<79> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<80> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<81> <실시예 1> 사과로부터 MADS 박스 유전자의 클로닝 및 이의 염기 서열 분석

<82> 열매 발달 초기의 사과 (*Malus domestica* Borkh vs Fuji) 꽃의 암술을 시료로 하여 제조된 cDNA 라이브러리 (SUNG. S.K. *et al*, *Mol. cells*, 1998, 8: 565-577)를 *in vivo excision* 방법 (stratagene, USA, Catalog #200450)에 따라 cDNA를 분리하여 cDNA 풀 (pool)을 제작하였다. 유전자 염기서열 데이터 베이스인 GenBank (NIH, USA)에 수록된 MADS 박스 유전자들을 검색한 뒤 상기 유전자에서 가장 보존적인 염기서열 부분으로부터 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 제작하였다. 이렇게 제작되어진 서열번호 3으로 기재되는 정방향 프라이머와 서열번호 4로 기재되는 역방향 프라이머 쌍을 이용하고, 성숙한 사과 꽃의 암술 cDNA 풀을 주형으로 하여 degenerate PCR을 수행하였다.

<83> PCR 반응의 조성은 100 ng의 cDNA 주형, 10 μ M의 프라이머, 20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 2.5 unit의 폴리머라제 (*Thermus aquaticus* DNA polymerase) (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 반응 조건은 퍼킨 엘머 (Perkin Elemer) 9600을 사용하여 94°C에서 3분간 열변성 (denaturation)시키고, 열변성과 프라이머 결합반응 (annealing) 및 길이연장반응 (extension)을 각각 94°C/30초, 60°C/1분, 72°C/1분간 1 사이클 (cycle)을 수행한 후, 이어서 프라이머 결합 온도를 50°C까지 단계별로 1°C씩 낮추어서 PCR을 수행하는 touch down PCR을 하였다. 또한, 마지막 50°C 단계에서는 10 사이클을 수행하였고, 말단 연장 (elongation)을 72°C/5분간 하여 전 증폭과정을 종결 시켰다. 이런 반응으로 얻은 증폭산물을 10배 희석 (dilution)하여, 다시 서열번호 5로 기재되는 정방향의 degenerate 프라이머를 제작하고, 이전 단계에서 사용한 서열번호 4로 기재되는 역방향의 degenerate 프라이머와 함께 다시 degenerate PCR을 수행하였다 (nested

degenerate PCR). 반응은 상기 기술된 동일한 반응 조성과 동일한 조건으로 94℃에서 3분간 열변성 (denaturation)시키고, 열변성과 프라이머 결합반응 (annealing) 및 길이연장반응 (extension)을 각각 94℃/30초, 60℃/1분, 72℃/1분간 1 사이클 (cycle)을 수행한 후, 이어서 프라이머 결합 온도를 50℃까지 단계별로 1℃씩 낮추어서 PCR을 수행하는 터치다운 (touch down) PCR을 하였다. 또한, 마지막 50℃ 단계에서는 10 사이클을 수행하였고, 말단 연장 (elongation)을 72℃/5분간 하여 전 증폭과정을 종결함으로서 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T Easy 벡터 (Promega, USA)에 클로닝한 후 T7 프라이머와 SP6 프라이머를 이용하여 증폭산물의 염기서열을 조사하였다.

<84>

조사된 687 bp의 염기서열은 상동성 분석 프로그램 (blast, NCBI, USA)을 이용하여 분석한 결과, MADS-박스 유전자 군의 부분 유전자임을 확인하였다. 이 부분 유전자의 염기서열 정보를 기초로 서열번호 6으로 기재되는 정방향의 프라이머와 서열번호 7로 기재되는 역방향 프라이머를 제작하여 상기 기술한 동일한 PCR 반응 조성으로 94℃에서 3분간 열변성시킨 후 열변성, 프라이머 결합, 길이연장 반응을 각각 94℃/30초, 60℃/1분, 72℃/1분간 35 사이클 (cycle)을 수행하였으며 말단 연장을 72℃/5분간 하여 전 증폭과정을 종결 시켰다. 사용된 정방향 프라이머는 pBluescriptSK(-) 벡터 (Stratagene, USA)의 제한 효소를 포함하는 염기서열을 기초 제작되었고, 역방향의 프라이머는 상기 기술한 부분 유전자의 염기서열 정보를 기초로 제작되었다. 이런 PCR 반응으로 약 450bp의 증폭산물을 얻을 수 있었으며 이 증폭산물을 pGEM-T Easy 벡터에 클로닝한 후 T7 프라이머와 SP6 프라이머를 이용하여 증폭산물의 염기서열을 조사하였다. 조사된 염기서열을 상동성 분석 프로그램 (blast, NCBI, USA)을 이용하여 분석한 결과, 이 PCR 증폭산물은 687 bp 일부분 유전자의 5말단 부위임을 확

인하였다. 확인된 염기 서열을 기초로 다시 서열번호 8로 기재되는 정방향 프라이머와 서열번호 9로 기재되는 역방향 프라이머를 제작하여 상기 기술한 동일한 반응 조성으로 94℃에서 3분간 열변성시킨 후 열변성, 프라이머 결합, 길이연장 반응을 각각 94℃/30초, 60℃/1분, 72℃/1분간 35 사이클 (cycle)을 수행하였으며 말단 연장을 72℃/5분간 하여 전 증폭과정을 종결 시켰다. 그 결과, 약 910 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 상기 증폭산물을 pGEM-T Easy 벡터에 클로닝한 후, *Escherichia coli* 균주인 XL1-Blue MRF'에 전이하여 플라스미드를 분리하였다.

<85> 분리된 플라스미드 염기서열을 조사한 결과, 염기서열의 상동성은 매우 높으나 아미노산 서열이 다른 두 종류의 유전자, 도 1과 도 2에 도시된 바와 같은 2개 유전자의 염기서열을 얻을수 있었다 (full-length sequence).

<86> 그 결과, 서열번호 1로 기재되는

도 1의 전체 염기서열 및 서열번호 2로 기재되는 도 2의 전체 염기서열을 얻을 수 있었다. 또한, 서열번호 2로 기재되는 전체 염기서열을 컴퓨터 소프트웨어 프로그램인 MegAlign (DNASTar Inc., USA)을 이용하여 클러스탈 방법 (Clustal method)으로 분석한 결과, 서열번호 1로 기재되는 유전자와는 서열이 다른 신규한 유전자임을 알 수 있었다. 도 1에 도시된 바와 같이 서열번호 1로 기재되는 유전자는 242개의 아미노산으로 구성된 개방 해독 판독틀 (open reading frame, ORF)을 코딩하는 염기서열을 가지고 있으며, 아미노 말단 부위에 MADS-박스 영역을 코딩하는 염기서열을 가지고 있어 'MdMADS14'라 명명하였다. 도 2에 도시된 바와 같이 MdMADS16 유전자 또한 242개의 아미노산으로 구성된 개방 해독 판독틀 (open reading frame, ORF)을 코딩하는 염기서열을 가지고 있어 상기 개방 해독 판독틀은 MdMADS14 유전자의 것과 크기가 같았고, 아미노 말단 부위에 MADS-박스 영역을 코딩하는 염기서열을 가지고 있었다. 이에 서열번호 2로 기재되는 유전자를 'MdMADS16'이라 명명하였다.

<87>

MdMADS14와 MdMADS16 유전자의 242개 아미노산 서열의 상동성은 88.4%이고, MADS-박스 부분의 두 유전자의 상동성은 98.3% 이고, MADS-박스 부분을 제외한 부분에서의 상동성은 85% 이상이였다 (도 3). 이 서열의 유사성의 정도는 종을 건너 MADS-박스 유전자군들이 공통적으로 매우 상동성있게 가지고 있는 것으로 여겨지기 때문에 MdMADS14 및 MdMADS16 유전자와 아미노산 수준에서 동일성을 갖는 유전자는 MADS-박스 부분 이외에서의 상동성으로 판단되어야 할 것이라고 여겨진다. 따라서 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자는 서로 같은 패밀리의 한 구성원 (member)이라 여겨지고, 도 4에 도시된 바와 같이 다른 MADS-박스 유전자와의 계통도 (phylogenetic

tree)를 그려 본 결과에서도 다른 MADS-박스 유전자 관계보다도 유전자의 관계가 더욱 밀접해 있음을 볼 수 있었다.

<88> <실시에 2> 실시간 PCR 및 RT-PCR을 이용한 MdMADS14 유전자의 기관 및 발달 단계별 발현 분석

<89> MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자의 보다 다양한 기관 및 발달 단계별 발현 정도를 조사하기 위하여 실시간(real time) PCR 및 RT-PCT를 수행하였다. 이때 사용한 샘플은 사과 잎과 어린 꽃눈, 성숙한 꽃, 수분 후 7 내지 8일이 지난 어린 과실, 후숙이 이루어진 과일을 사용하였고, 이들로부터 전체 RNA를 뽑아 역전사-중합 효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, 이하 'RT-PCR'이라 약칭함) 및 실시간 PCR에 사용하였다.

<90> <2-1> 실시간 PCR

<91> 실시간 PCR은 SYBR green I 형광 염색 시약(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 각 기관 및 발달 단계별 유전자의 발현정도를 비교 정량하였다. 구체적으로, 상기 수득한 샘플에서 추출한 전체 RNA를 2 μ g을 사용하여 일차-가닥 cDNA 풀을 만들었다. 실시간 PCR 반응 중 비특이적 증폭산물이나 프라이머 다이머(primer dimmer)가 생기지 않는 조건을 확립하기 위하여 프라이머 농도 최적화 실험을 실시한 결과 MdMADS14 증폭용 프라이머(서열번호 10으로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열번호 11으로 기재되는 역방향 프라이머)는 최종농도 50 nM/300 nM(정방향 프라이머/역방향

프라이머)에서 최적의 반응을 보였고, MdMADS16 증폭용 프라이머 (서열번호 12로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열번호 13으로 기재되는 역방향 프라이머)는 최종농도 900 nM/900 nM (정방향 프라이머/역방향 프라이머)에서 최적의 반응을 보였으며, 내부 대조군 (internal control)으로 사용한 액틴 (actin) 프라이머 (서열번호 14로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열번호 15로 기재되는 역방향 프라이머)는 최종 농도 900 nM/900 nM (정방향 프라이머/역방향 프라이머)에서 최적의 반응을 보였다.

<92>

각 프라이머는 반응 중 증폭 산물이 120 bp 이내의 크기로 증폭되어지게 제작을 하여 짧은 반응 시간 내에 정확한 측정을 할 수 있도록 하였다. 실시간 PCR 반응은 각 기관 및 단계별 일차-가닥 cDNA 풀을 주형 (template)으로 하고, 상기에서 확립한 최적 농도의 프라이머를 사용하여 반응시켰다. PCR 반응조건은 반응 조성물을 넣고 50℃에서 2분간 중합효소를 활성화시키고, 95℃에서 10분간 주형을 완전 열변성 (denaturation)시킨 후 다시 95℃에서 15초간 주형을 열변성시키고, 60℃에서 1분 동안 프라이머와 주형을 혼성화 (hybridization 또는 annealing) 시키면서 이를 총 40회 반복시켜 반응 산물을 증폭하고, 매회 반응 단계별로 증폭 산물에 결합된 형광 염색 시약의 강도를 측정하여 증폭산물의 양을 측정하였다. MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자의 발현정도의 분석은 각 기관 및 발달 단계별 샘플에서 일정한 발현양을 보이는 내부 대조군인 액틴의 발현양에 비해 MdMADS14 유전자 및 MdMADS16 유전자가 얼마만큼 발현되었는가를 측정하여 비교 정량분석 하였다.

<93>

그 결과,

도 5에서 도시된 바와 같이 MdMADS14 유전자는 어린 꽃눈에서 강하게 발현되기 시작하여 열매 초기 발달단계까지 강하게 발현됨을 볼 수 있었다. 이에 반해 사과와 사과와 성숙한 과일에서는 발현양이 극히 적음을 알 수 있었다. MdMADS16 유전자도 어린 꽃눈에서 발현되기 시작하여 열매 초기 발달단계까지 발현됨을 볼 수 있었고, 성숙한 꽃에서 비교적 발현양이 높아짐을 볼 수 있었다. 추가적으로, MdMADS16 유전자는 MdMADS14 유전자보다 발현양이 전체적으로 매우 낮음을 볼 수 있었다. 각 반응 생성물의 특이성을 검증하기 위하여 녹는점 곡선 분석(melting curve analysis)을 수행한 결과, 반응 중 생성된 MdMADS14와 MdMADS16는 서로 다른 녹는점 온도(melting temperature)를 가진 다른 반응 생성물임이 증명되었다.

<94> <2-2> RT-PCR 및 PCR 서던 블랏

<95> 상기 실시간 PCR 실험의 정확성을 검증하기 위하여 전통적인 RT-PCR을 이용하여 반응 증폭산물이 지수적으로 증가하는 조건을 설정하여 그 범위 내에서 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자의 정량적 분석을 실시하였다. RT-PCR 반응은 상기 실험에 사용한 각 기관 및 단계별 일차-가닥 cDNA 풀을 주형(template)으로 상기 실시예 <2-1>에서 사용한 MdMADS14 유전자, MdMADS16 유전자 또는 액틴 유전자의 프라이머를 각각 사용하여 RT-PCR을 하였다. 또한, 각각의 증폭 산물을 아가로스젤상에서 전기영동한 후 나이트란 막(Hybond N+)으로 전이시켰다. 그리고, MdMADS14 유전자, MdMADS16 유전자 또는 액틴 유전자를 바이오틴(biotin)으로 표지한 프로브를 제작한 후 서던 키트(Southern-Star™ System, Applied biosystems, USA)를 이용하여 PCR 서던을 실시하였다.

<96> 그 결과, 도 6에서 도시된 바와 같이 MdMADS14 유전자는 어린 꽃눈에서 강하게 발현되기 시작하여 열매 초기 발달단계까지 강하게 발현됨을 볼 수 있었다.

MdMADS16 유전자 또한 어린 꽃에서 발현되기 시작하여 성숙한 꽃에서 발현양이 약간 높아짐을 볼 수 있었다. 그러나, MdMADS14 유전자의 발현양에 비해 MdMADS16 유전자의 발현이 너무 낮기 때문에, 같은 조성과 시간으로 반응 시켰을 때 실시간 PCR의 결과만큼 정확한 결과를 얻기 힘들었지만 실험 결과는 상기 도 5의 실시간 PCR 결과와 일치함을 알 수 있었다.

<97> <실시에 3> 정위치 혼성화 반응 (*in situ* hybridization)을 이용한 MdMADS16 유전자의 mRNA 발현양상 조사

<98> 사과와 어린 꽃눈과 수분후의 꽃을 대상으로 MdMADS16 유전자의 mRNA 발현 양상을 조사하였다. 상기 각 샘플을 적당한 크기로 자른 뒤 고정액으로 고정하여 파라핀 포매 (paraffin embedding)시킨 후 10 μ m 두께로 잘라 프로브 (probe)와 혼성화 반응을 시켰다. 본 발명에서 사용한 프로브는 MdMADS16 유전자의 상보적인 염기서열을 덕 (DIG)으로 레이블하여 사용하였다. 이때 프로브의 염기서열은 다른 MADS-박스 유전자들이 공통적으로 가지고 있는 MADS 도메인 및 K-도메인의 염기서열이 포함되지 않게 제작하였으며, 서열번호 16으로 기재되는 염기서열을 가지는 프로브를 사용하여 실험을 실시하였다. 그러나 이 부위의 MdMADS16 유전자와 MdMADS14 유전자의 상동성은 적어도 88% (88.1%) 이상이기 때문에 두 유전자간의 특이성에 대해서는 확신할 수 없으나, 결과적으로는 도 7에서 도시한 바와 같이 MdMADS16 유전자는 화기 정단 부분

과 배주 부분에서 강하게 발현됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 MdMADS16 유전자는 화기 형성 및 열매와 종자발달에 관여할 것임을 알 수 있었다.

<99> <실시에 4> MdMADS14 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 생산

<100> 상기 실시예 1에서 사과로부터 분리한 MdMADS14 유전자를 포함하는 DNA절편을 *Pst* I 및 *Hind*Ⅲ로 절단한 다음, 동일한 효소로 절단된 pBluescriptSK(-) 벡터 (Stratagene, USA)에 클로닝한 후, 과발현용 재조합 벡터는 이를 다시 *Xba* I 및 *Cla* I 으로 절단한 다음, 동일한 효소로 절단된 식물 형질전환용 벡터인 pGA1530 벡터에 정방향으로 클로닝을 하였다. 또한 유전자 발현 억제용 재조합 벡터는 MdMADS14 유전자를 포함하는 재조합 pBluescriptSK(-) 벡터를 *Xba* I 및 *Hind*Ⅲ로 절단한 다음, 동일한 효소로 절단된 식물 형질전환용 벡터인 pGA1530 벡터에 역방향으로 클로닝을 하였다. 식물 형질전환용 pGA1530 벡터는 35S 프로모터와 T7 터미네이터를 가지고 있으며 선별 유전자로 *NPTII* (*neomycin phosphotransferase*) 유전자를 가지고 있어 카나마이신 저항성을 갖게 한다 (*Plant molecular Biology Manual*, 1988, A3:1-19). 이렇게 제작된 MdMADS14가 정방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 'pMdMADS14'라 명명하였고, MdMADS14가 역방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 'pMdMADS14-R'이라 명명하였다. 그리고 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404 (Hoekema, A. *et al.*, 1983, *Nature*, 303, 179-181)에 도입 후 카나마이신 배지에서 상기 재조합 플라스미드 pMdMADS14 및 pMdMADS14-R이 도입된 균주를 선발하였다. 선발된 pMdMADS14 재조합 플라스미드를 도입한 아그로박테리움 튜메파시엔스를 한국생명공학연구원 유전자은행에 2004년 1월 30일자로 기탁하였다 (수탁번호:KCTC 10588BP)

<101> pMdMADS14 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 제작하기 위하여 미니토마토를 이용하였다. 목적 조직의 선택을 위하여 미니토마토의 성숙 종자를 70% 에탄올에 1 분간 담근 후 멸균수로 3차례 헹군 후 2%의 NaOCl (Sodium hypochloride)에 15분간 침지하여 표면을 살균하고 멸균수로 7차례 이상 세척하였다. 그리고, 종자 발아 배지 (1/2 MS, 3% 수크로즈, 0.8% 아가)에 치상한 후, 약 14일 후에 발아가 시작되어 자엽이 전개된 후 본엽이 나오기 시작하면 그때 자엽을 목적 조직으로 선택하였다.

<102> 상기 실시예에 따라 제작된 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404 (Hoekema, A. *et al.*, 1983, *Nature*, 303, 179-181)를 50 mg/ℓ의 카나마이신이 포함된 YEP 배지 (1% 효모 추출물, 1% 펩톤, 0.5% NaCl)에서 OD₆₀₀ 측정값이 0.8이 될 때까지 배양하였다. 이렇게 배양된 아그로박테리움을 200 μM의 아세토시린곤 (acetosyringone)을 첨가한 1/2 MS 배지에서 22℃, 150 rpm으로 2시간 동안 공동 배양하였다. 그리고 나서, 목적 조직으로 선택된 미니토마토의 자엽 절편을 넣고 22℃, 150 rpm으로 10분간 배양하였다. 이후 자엽 절편을 다시 공동 배양 배지 (coculture medium: MS, IAA 1 μM, 제아틴 10 μM, 수크로즈 3%, 아세토시린곤 200 μM, 0.7% 아가)에 치상하여 2일간 배양하였다. 그리고 자엽 절편을 재분화 배지 (regeneration medium: MS, IAA 1 μM, 제아틴 10 μM, 수크로즈 3%, 세포탁심 (cefotaxime) 350 mg/ℓ, 카나마이신 50 mg/ℓ, 0.7% 아가)로 옮겨주고 3주마다 두 차례 계대하였다. 이때 자엽 절편에서 나오는 형질전환된 싌초를 다시 카나마이신이 첨가된 뿌리 유도 배지 (rooting medium: 1/2 MS, IAA 1 μM, 3% 수크로즈, 카나마이신 50 mg/ℓ, 0.7% 아가)에서 뿌리를 유도하면서 다시 한번 형질전환체를 선별하였다. 형질전환되지 않은 싌초는 색깔이 변하

면서 세포괴사(necrosis)가 일어나는데 비하여 형질전환된 신초는 뿌리를 내리면서 정상적으로 성장하였다. 뿌리가 유도된 신초는 순화과정을 거쳐 토양으로 옮겼다.

<103>

그 결과, 상기 과정을 통해 MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체는 두 개체에서 열매가 열리지 않는 공통된 표현형을 보였다. 또한, MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체는 모두 3개체에서 각기 다른 표현형이 나타났는데, 이를 형질전환체 1, 형질전환체 2, 형질전환체 3이라 명명했다. 각 형질전환체는 도 8에 도시된 바와 같이 *NPTII* 유전자의 발현 유무를 PCR을 통해 확인함으로써 MdMADS14 유전자가 도입되었음을 확인하였다. *NPTII* 유전자의 발현 유무 확인을 위한 PCR 반응에 사용한 프라이머로는 서열번호 17로 기재되는 정방향 프라이머와 서열번호 18로 기재되는 역방향 프라이머를 사용하였다.

<104>

<실시예 5> 형질전환 식물체 내에서의 MdMADS14 유전자의 기능 분석

<105>

상기 실시예 4에서 제작한 MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체와 유전자를 과발현시킨 형질전환체의 표현형을 분석하여 식물체 내에서의 MdMADS14 유전자 기능을 분석하였다.

<106>

그 결과, MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환 식물체는 2개체에서 열매가 열리지 않는 공통된 표현형이 나타났는데, 이는 도 9a 내지 도 9c에서 도시된 바와 같이 초기단계의 꽃기관 발달에는 영향이 없었으나 수분이후 씨 발달이 저해되고 따라서 과일 발육이 되지 않음이 확인되었다.

<107> 또한, 형질전환체의 발달 단계별 꽃기관 및 씨방을 고정액에 고정하고 플라스틱 포매 (plastic embedding) 후 7 μ m의 크기로 샘플을 잘라 톨루이딘 블루 0 (Toluidine blue 0) 염색 시약으로 염색을 한 후 조직학적 관찰을 하였다.

<108> 그 결과, 도 9b와 도 9c에 도시된 바와 같이 배주의 발달이 초기 꽃기관에서는 별 차이가 없었으나 수분 이후 배주의 발달 및 씨방의 발달이 이루어지지 않음을 관찰할 수 있었다. 또한, MdMADS14 유전자의 발현을 과발현시킨 형질전환 식물체에서는 모두 3개체에서 서로 다른 표현형이 나타났는데, 형질전환체 1에서는 열매의 후숙은 늦어지는 반면 종자의 발달이 촉진되었고, 형질전환체 2에서는 꽃받침이 과육으로 전환되고 단위결실과가 생성되었다. 형질전환체 3에서는 꽃잎이 꽃받침으로 전환되어지는 표현형을 각기 보였다.

<109> 또한, 도 10 및 도 11에 도시된 바와 같이 형질전환체 1의 열매는 같은 시기의 비형질전환체보다 후숙이 늦어지고, 종자가 열매 안에서 발아되어지는 등 종자 발달이 촉진되는 표현형이 나타났는데, 이런 형질은 T0 세대 뿐만 아니라 T1 세대에서도 반복되어 나타난 것으로 보아 형질이 유전되었음을 알 수 있었다.

<110> 이를 보다 더 확실히 검증하기 위하여 형질전환체 1의 T2세대 종자를 대상으로 발아기간 측정을 해보았다. 먼저 도 11에 도시된 비형질전환체 토마토 종자와 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 1의 종자를 각각 25개씩 수확한 후 10일동안 건조를 시켰다. 그 후 페트리디쉬에 필터 종이를 깔고 증류수를 적신 후 5일간 25℃에서 배양을 하였다. 종자가 발아되는 기간을 각각 측정하여 통계분석을 실시 하였다. 그 결과, 도 12와 도 13에 도시된 바와 같이 종자의 발달은 비형질전환체 보

다 촉진되어지는 표현형을 나타냈다. 또한, 이러한 결과를 통계 분석을 하여보면, 표 1에서 도시된 바와 같이 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체 1의 종자는 평균 발아기간이 1.77일인데 비해 비형질전환 토마토 종자의 평균 발아기간은 3.8일 내지 4.4일 정도로 측정되었다. 본 실험 조건으로는 비형질전환체 토마토 종자의 발아율이 50% 정도로 낮게 나왔으나 형질전환체 종자 발아율은 100%인 것으로 나왔다. 이는 일반적으로 알려져 있는 종자의 발아율, 즉 일반배지나 토양에서의 토마토 종자 발아율인 80~90% 보다 높은 결과이다.

<111> 【표 1】

	형질전환체 1 종자 (T2)	비형질전환체 종자 (1차)	비형질전환체 종자 (2차)	토마토 종자 평균 발아율
평균 발아일	1.77일	4.4일	3.8일	평균 4 내지 5일
발아율	100%	52%	50%	80 내지 90%

<112> 또한, MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 2에서는 꽃받침이 과육으로 전환되어지는 표현형을 보였다. 도 14에서 도시된 바와 같이 형질전환체 2는 비형질전환체에 비하여 꽃받침이 과육으로 전환되어 비대해지는 표현형이 나타났고 종자형성이 없는 단위결실과 (parthenocarp fruit)가 열렸다.

<113> 그리고, MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 3에서는

도 15에서 도시된 바와 같이 꽃잎이 꽃받침으로 전환되어지는 표현형을 나타냈다.

이러한 현상은 도 16에서 도시된 바와 같이 토마토의 TM29 유전자가 억제되었을 때 나타나는 현상과 비슷한 결과를 보였다 (Charles Ampomah-Dwamena *et al*, 2002, 130: 605-617). TM29 유전자는 토마토의 화기 및 열매발달 단계에서 폭넓게 발현되는 유전자로서 이를 과발현시켰을 때는 형질전환 식물체에서 별다른 표현형이 나타나지 않으나, 발현을 억제시켰을 때는 꽃잎과 수술이 꽃받침으로 전환되거나 배주가 발달이 안되고 단위결실과를 형성하는 표현형을 나타낸다. 형질전환체 3에서도 심피부분에 배주가 발달이 안되고 비정상적인 분열조직이 생겨 단위결실과를 형성하는 것을 볼 수 있었다. MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 3에서 TM29 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 형질전환체의 꽃과 비형질전환체의 꽃에서 전체 RNA를 뽑아 2 μ g의 전체 RNA를 사용하여 RT-PCR로 비교 정량을 하였다. TM29 유전자를 증폭하기 위해 사용한 프라이머로는 서열번호 19로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열번호 20으로 기재되는 역방향 프라이머를 사용하였다.

<114> PCR 반응은 증폭산물이 지수적으로 증가하는 조건을 설정하여 그 범위 내에서 TM29 유전자 발현양의 정량적 분석을 실시 하였다. 그 결과, 도 17에서 도시된 바와 같이 MdMADS14 유전자가 과발현된 형질전환체에서 TM29 유전자의 발현이 억제됨을 확인하였다.

<115> <실시에 6> MdMADS16 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 생산 및 식물체 내에서
의 MdMADS16 유전자의 기능 분석

상기 실시예 1에서 사과로부터 분리한 MdMADS16 유전자를 포함하는 DNA절편을 *Pst* 및 *Hind*Ⅲ로 절단한 다음, 동일한 효소로 절단된 pBluescriptSK(-) 벡터 (Stratagene, USA)에 클로닝한 후, 이를 다시 *Bam*H 및 *Hind*Ⅲ로 절단하고 필인 (fill in)시켰다. 그리고 pRTL2 (Restrepo, M. *et al.*, *Plant Cell*, 1990, 2: 987-998) 벡터를 *Sma*I으로 절단한 후, MdMADS16 유전자를 서브 클로닝하였다. 상기 과정으로 재조합된 플라스미드는 MdMADS16 유전자가 정방향으로 들어간 것과 역방향으로 들어간 것이 모두 존재함으로 염기서열 분석을 통하여 정방향으로 클로닝된 것과 역방향으로 클로닝된 것을 분리하였다. 그리고 이것을 각각 *Hind*Ⅲ로 절단하고, 동일한 효소로 절단된 식물 형질전환용 벡터인 pCAMBIA 2301 (CAMBIA, Australia) 벡터에 클로닝을 하였다. 식물 형질전환용 pCAMBIA 2301 벡터는 35S 프로모터와 NOS (*nopaline synthase*) 터미네이터를 가지고 있으며 선별 유전자로 *NPTII* (*neomycin phosphotransferase*) 유전자를 가지고 있어 카나마이신 저항성을 갖게 한다. 이렇게 제작된 MdMADS16이 정방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 'pMdMADS16'이라 명명하였고, MdMADS16이 역방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 'pMdMADS16-R'이라 명명하였다. 그리고 아그로박테리움 튜메파시엔스 LBA4404 (Hoekema, A. *et al.*, 1983, *Nature*, 303, 179-181)에 도입 후 카나마이신 배지에서 상기 재조합 플라스미드 pMdMADS16 및 pMdMADS16-R이 도입된 균주를 선발하였다. 선발된 pMdMADS16 재조합 플라스미드를 도입한 아그로박테리움 튜메파시엔스를 한국생명공학연구원 유전자은행에 2004년 1월 30일자로 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 10589BP)

<117> 이어서 상기 발현 벡터를 실시예 3에서 기술한 바와 같이 미니토마토에 형질전환시켰다. 이런 과정을 통해 제작된 MdMADS16 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체에서는 도 18에 도시된 바와 같이 MdMADS14 유전자의 발현을 억제시킨 형질전환체와 마찬가지로 수분 이후 열매가 열리지 않는 표현형을 보였다. 이를 통해 MdMADS14 유전자나 MdMADS16 유전자 발현을 억제시켰을 때는 공통적으로 열매가 열리지 않음을 볼 수 있었다.

<118> 또한, MdMADS16 유전자의 발현을 과발현시킨 형질전환 식물체에서는 2가지의 표현형이 나타났는데 이런 표현형들은 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체의 표현형과 일치하는 표현형이었다. 먼저, 도 19에 도시된 바와 같이 MdMADS16 유전자를 과발현시킨 형질전환 식물에서는 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 1에서와 같이 열매 후숙이 늦어지는 반면 종자가 열매 안에서 발아되어지는 현상을 보이는 형질전환체를 얻을 수 있었다.

<119> 또한, 다른 MdMADS16 유전자의 과발현 형질전환 식물체에서도 도 20에 도시된 바와 같이 꽃받침이 과육으로 변하는 표현형을 볼 수 있었고, 이러한 표현형은 MdMADS14 유전자를 과발현시킨 형질전환체 2의 표현형과 일치하는 것이었다.

<120> 상기 실시예를 통해 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자는 매우 상동성이 높은 유전자로서 같은 패밀리의 구성원임이 확실히 되어지고, 형질전환체를 통해 분석되어지는 유전자의 기능 분석에서도 두 유전자가 열매발달 및 종자발달에 관여하는 유전

자임을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 사과로부터 분리한 MdMADS14 유전자와 MdMADS16 유전자는 기존의 MADS 박스 유전자에서 밝혀진 기능에서는 확인할 수 없는 열매발달 및 종자발달을 조절하는 신규한 기능을 하는 유전자임을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<121> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 유전자는 열매발달 및 종자발달을 조절하는 유전자로서, 상기 유전자를 형질도입시킨 형질전환 식물체는 열매의 후숙과정을 지연시키고, 상기 유전자를 형질도입시킨 형질전환 식물체는 종자발달을 촉진시키고, 본 발명의 유전자를 이용하면 단위결실과 생산 및 열매발달과 종자발달을 조절하는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자, MADS-박스를 코딩하는 염기서열을 포함하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자 및 상기 유전자의 MADS-박스 영역 이외의 부분에서 적어도 85% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 열매 및 종자 발달 조절용 유전자.

【청구항 2】

제 1항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자를 정방향으로 포함하는 발현벡터 pMdMADS14 (수탁번호: KCTC 10588BP).

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 유전자를 정방향으로 포함하는 발현벡터 pMdMADS16 (수탁번호: KCTC 10589BP).

【청구항 5】

제 3항 또는 제 4항 중 어느 한 항의 발현벡터를 형질도입한 형질전환 식물세포

【청구항 6】

제 3항 또는 제 4항 중 어느 한 항의 발현벡터를 형질도입한 형질전환 토마토

세포.

【청구항 7】

제 5항의 형질전환 식물세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 제조되는 열매 및

종자 발달 억제용 또는 촉진용 형질전환 식물체.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀

, 쌀, 귀리, 수수와 같은 식량작물류; 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이,

양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근과 같은 채소작물류; 인삼, 가시오가피, 담배,

목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채와 같은 특용작물; 사과나무, 배

나무, 오렌지, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나와 같

은 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립과 같은

화훼류; 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이

그라스와 같은 사료작물류; 목화와 같은 섬유작물류; 그리고 꽃 및 관목과 같은 다양한 장식식물로 구성된 군으로부터 선택되는 형질전환 식물체.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 배주발달이 되지 않아 열매 및 종자발달이 억제되는 표현형, 꽃받침이 과육으로 전환되고 단위결실과가 생성되는 표현형, 꽃잎이 꽃받침으로 전환되고 단위결실과가 생성되는 표현형 또는 종자발달이 촉진 또는 후숙과정이 지연되는 표현형을 나타내는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

【청구항 10】

- 1) 열매 및 종자 발달 조절 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 발현벡터를 아그로박테리움에 도입하는 단계;
- 3) 상기 아그로박테리움과 식물 세포를 공동배양하여 상기 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및
- 4) 상기 형질전환된 식물세포를 조직배양하여 재분화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 열매 및 종자 발달 억제용 또는 촉진용 형질전환 식물의 제조방법.

【청구항 11】

제 1항의 유전자를 유효성분으로 함유하는 종자발달 및 열매발달 억제제 또는 촉진제.

【도면】

【도 1】

```

ACCCACTTCCCACTTCTGTGCATTCTTCTCCCTCCGGTTGCGCAAGTGCACACCCCAAAAGAAAA 60
ACTCAAAGTCAAGAACTAACAGAAAGAGCCACAAATCCATCTAATTTTGAGGGGTTTTTTGCC 120
ATTTTTCATCCTTGTAAACCAATGAGGTTCCGAAATCAAGCACCCTGAGAGCTCTACCCAAAA 180
M E F A N Q A P E S S T Q K
AAAAATTGGGAGAGGGCAAAATTGAGATTAAAGCGGATCGAAARCCCTACCAATCGACAAGT 240
K L G E G K I E I K R I E N T T N R Q Y MADS-박스
GACCTTCTGCAAAACGGCGCAACGGATTGCTTAAGAAAGCCTATGAATTGTCTGTCTTTG 300
T F C K R R N G L L K K A Y E L S V L G
TGATGCTGAGGTGCTCTTATCGCTCTCTCCACCCTGCGCGCTCTCTATGAGTATGCTAA 360
D A E V A L I V F S T R S R L V H Y A N
CAACAGCGTTAGAGCAACAATCGACAGGCTACAAAAAAGCATGCGCTGATTCTACGGACGG 420
N S V R A T I D R Y K E A C A D S T D G K-도메인
TGGATCTGTATCAGAAAGCTAACACTCAGTTTTPATCAGCAGGAGGCATCAAAACTGCGAAG 480
G E V S E A N T Q F Y Q Q E A S K L R R
ACAGATCCGAGAAATTCGAATTCAAAACAGGCATATACTGGGGGAATCCCTTAGCACCTT 540
Q I R E I Q N M M R H I L G E M L S T L
GAAAGTCAAGGAAGTGAAGAAAGCTAGAAAGCAAGATTGCAAGAAAGGAATCAGCAGAAATAAG 600
K V K E L K M L E G R L E K G I S R I R
ATGCAAAAAGAAATGAAATGCTGTTTTCTGAAATCGAATTCATGCAAAAGAGGGGAGACTGA 660
S K K N E E F S R E E F M Q K R E T E
GCTGCAACAGCAACAAGATTTTCTGAGAGCAAAAGATAGCTGAAAGCGAGAGGGAAACAGCA 720
L Q H H N N F L R A E Y A E S R R E Q Q
GCAGCAGCAACACAGATATGATTCCGGGGAAGCTTCTACGATCCGTGATGCGCTTCGAATTC 780
Q Q Q T H M I F G T S Y D F S M F S N S
GTATGACAGGAACTTCTTCCCTGTGATCTTGGAGTCCAATAATAAGCATTACCGCTCGCCA 840
Y D R N F F P V I L E S M N M H Y P R Q
AGGCAGACAGCTCTCCAACTTCTTTTGAATGCTGCACTGCCCTCTGATGTTCTTCTATC 900
G Q T A I Q L V
CATATCCTCTGATCTGTCTTCAATAATCTATGACATAATTGACGTTCTAGTTTTHATCTA 960
TATGGAGAAACCAAGTTTGGCTCATGCTTCTCCATAATATATATATATGCTGTCATGATCGACCCC 1020
AATTCTGTGATAACATAATAGTAAATTTTATTTTCTCACCCCCGA 1065

```

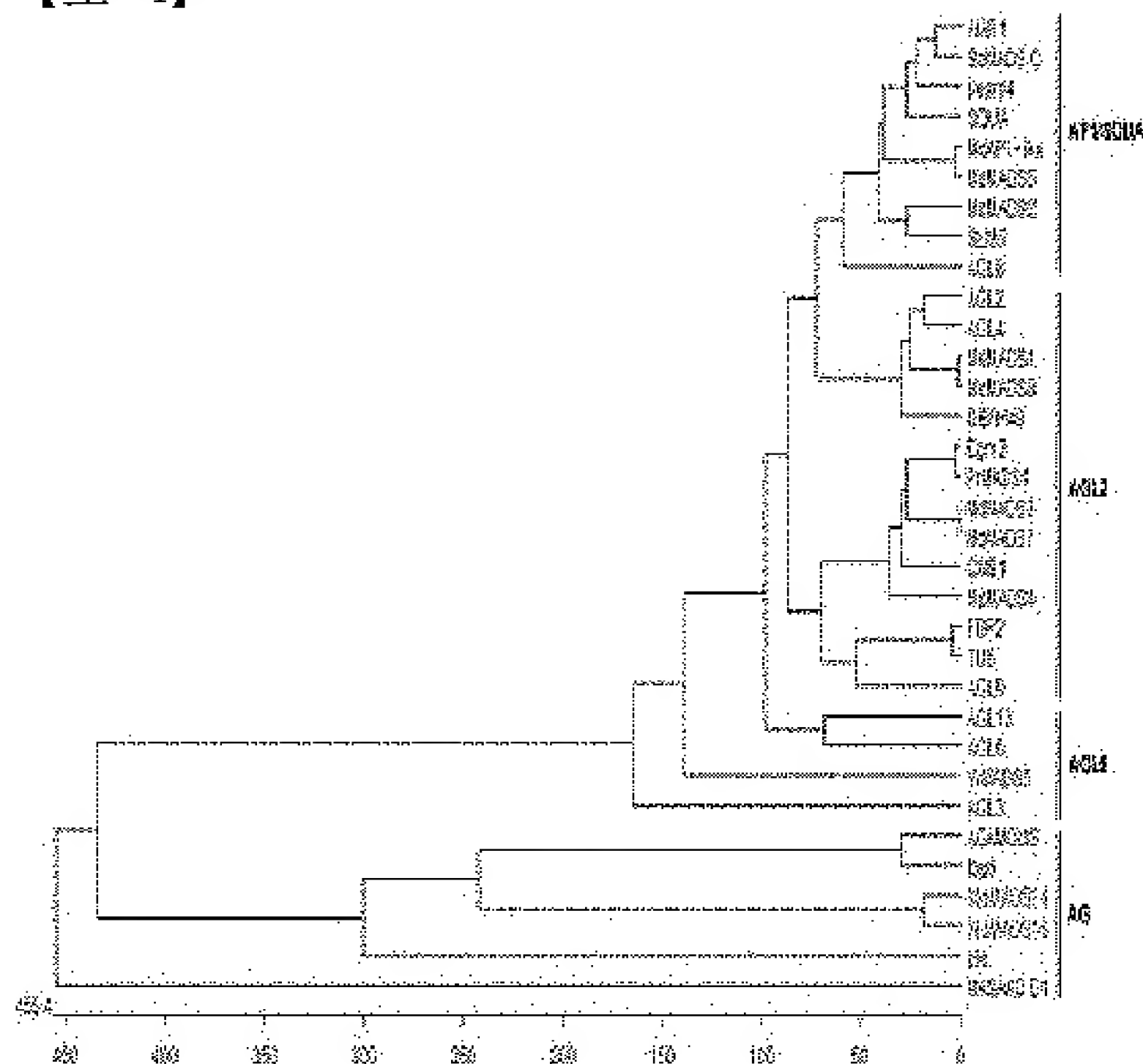
【도 2】

GCAATTCTTCCTTC CCGTTGCCAAGTGCAACCCCAATAGAAAACTCAAAGTCAAGAACT 60
 AGCTAACAGAGAAAAACCACAATTTCATCAATTTGGAGGGGTTTTTGGCATTTTTCATCCTT 120
 GCAACAATGGAGTTCCCAAATCAAGCACCCGAGAGCTCCTCCAGAAAAAATTGGGAAGG 180
 M E F P N Q A P E S S S Q K K L G R MADS-박스
 GGCAAAATTGAGATTAAAGCGGATCGAAAACACTACAAATCGACAAGTTACCTTCTGCAAA 240
G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K
 CGCCGCAACGGATTGCTTAAGAAAGCC TATGAATTGTCTGTTCTTTGTGATGCTGAAGTT 300
R R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V
 GCTCTTATCGTGTTCCTCCAAACCGTGCCCGCCTCTATGAGTATGCTAACAAACAGTGTTAGA 360
A L I V F S N R G R L Y E Y A N N S V R
 GCAACAATCGACAGGTACAAAAAGCATACGCTGATCCTACGAACAGTGGATCTGTTTCA 420
 A T I D R Y K K A Y A D P T N S G S V S K-도메인
 GAAGCCAACACTCAGTTTTATCAGCAGGAAGCATCCAAACTGCGAAGACAGATCCGAGAA 480
E A N T Q F Y Q Q E A S K I R R Q I R E
 ATTCAGAATTCAAACAGGCATATACTGGGTGAAGCTCTTAGCTCCTTGAACGCCAAGGAA 540
I Q N S M R H I L G E A L S S L N A K E
 CTGAAGAACCTAGAAGGAAGATTGGAGAAAGGAATCAGCAGAATAAGATCCAAAAAGAAT 600
L K N L E G R L E K G I S R L R S K K N
 GAAATGCTGTTTTCTGAAATCGAATTTCATGCAAAAAAGGGAGACCGAGCTGCAACACCAC 660
E M L F S E I E F M Q K R E T E L Q H H
 AACAAATTTCTGAGAGCAAAGATAGCTGAAAAAGAGAGGGGAGAGCAGCAGCATAACAC 720
N N E L R A K I A E N E R E E Q Q H T H
 ATGATGCGGGGAAC TTCCTACGATCAGTCAATGCCTTCGCATTCTTATGACAGGAAC TTC 780
 M M P G T S Y D Q S M P S H S Y D R N F
 CTCCAGSGGTGATCTTGGAGTCCAACAATAACCATTACGCTCACCAAGTCCAGACAGCT 840
 L P A V I L E S N N N H Y P H Q V Q T A
 CTCCAACITGTTTGAAATGCTGGACTGCCGTC TGAT 876
 L Q L V .

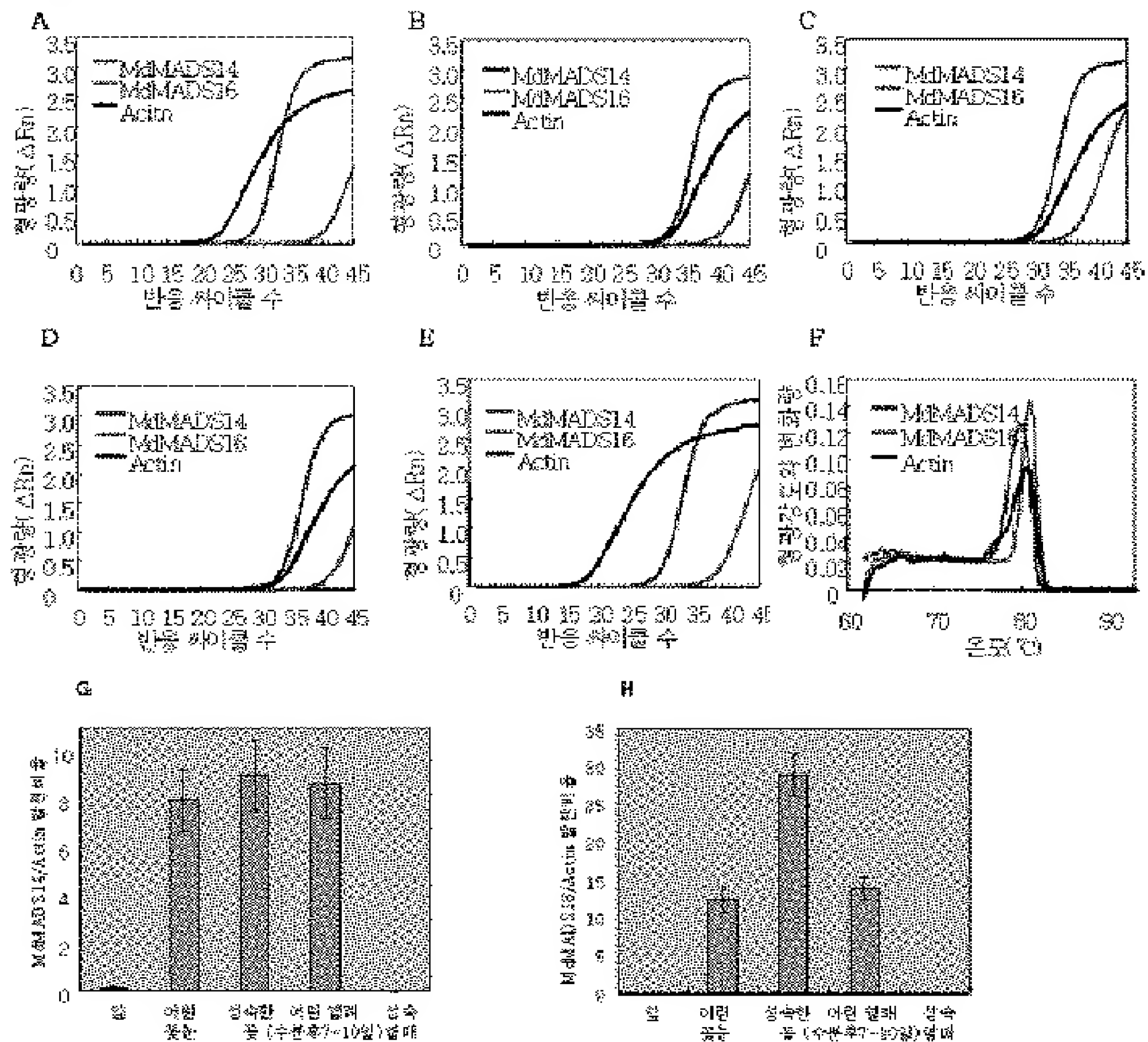
【도 3】

1	MEFANQAPESSTQKKLGKIEIKRIENTT	McMADS14
1	MEFPNQAPESSSQKKLGKIEIKRIENTT	McMADS16
31	NRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	McMADS14
31	NRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	McMADS16
61	IVFSTRGRLYEYANNNSVRATIDRYKKACAD	McMADS14
61	IVFSTNRGRLYEYANNNSVRATIDRYKKAYAD	McMADS16
91	STDGGSVSEANTQFYQQEASKLRQRQIREIQ	McMADS14
91	PTNSGGSVSEANTQFYQQEASKLRQRQIREIQ	McMADS16
121	NSMRHILGESLSTLKVKELEKNLEGRLEKGI	McMADS14
121	NSMRHILGEALSSSLNAKELEKNLEGRLEKGI	McMADS16
151	SRIRSKKNEILFSEIEFMQKRETELQHHNN	McMADS14
151	SRIRSKKNEMLFSEIEFMQKRETELQHHNN	McMADS16
181	FLRAKIAESEREQQQQQTHMIPGTSYDPSM	McMADS14
181	FLRAKIAENEREQQQH-THMMPGTSYDQSM	McMADS16
211	PSNSYDRNFPP-VILESNNNHYPRQGQTAL	McMADS14
210	PSHSYDRNFFLPVILESNNNHYPHQVQTAL	McMADS16
240	QLV (100%)	McMADS14
240	QLV (88.4%)	McMADS16

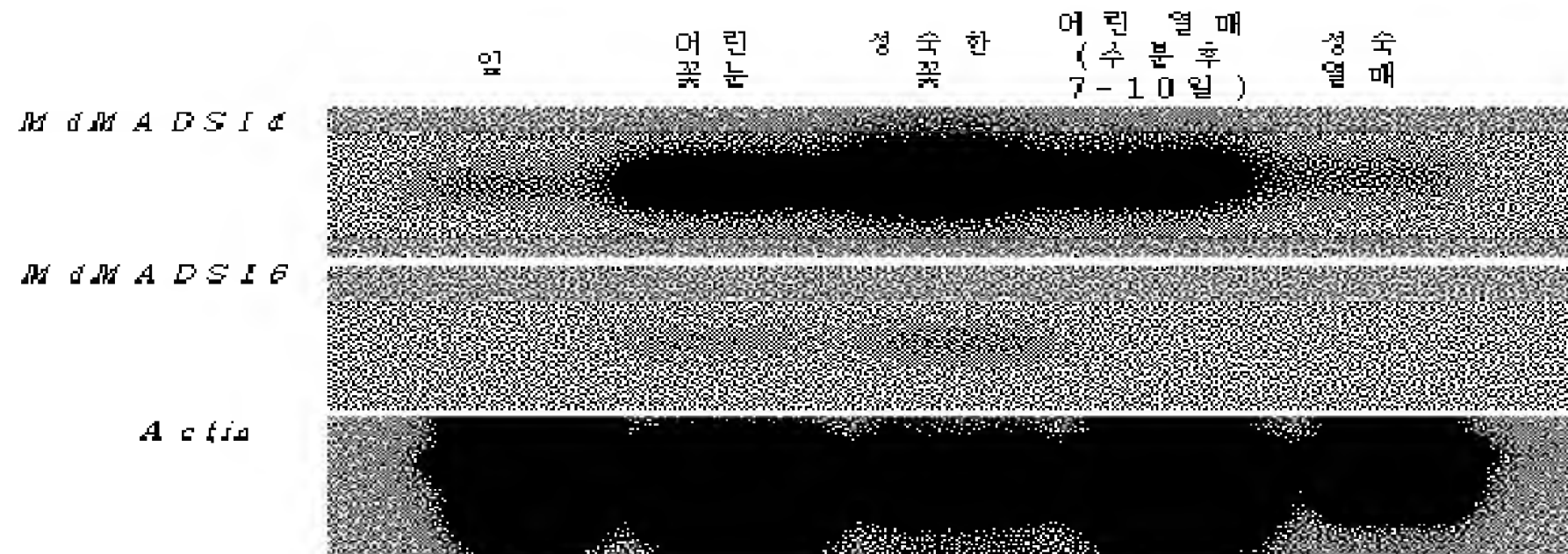
【도 4】



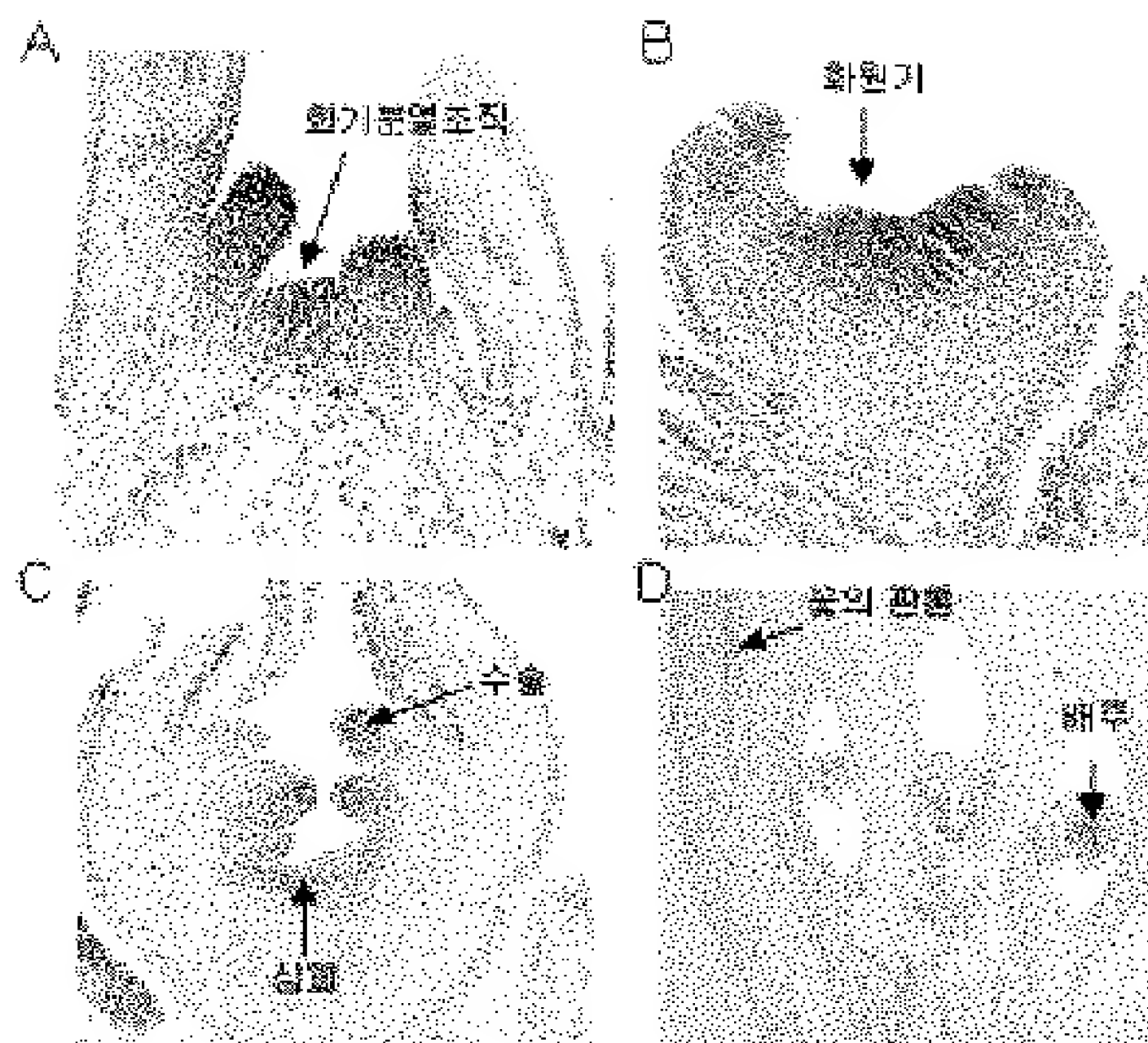
【도 5】



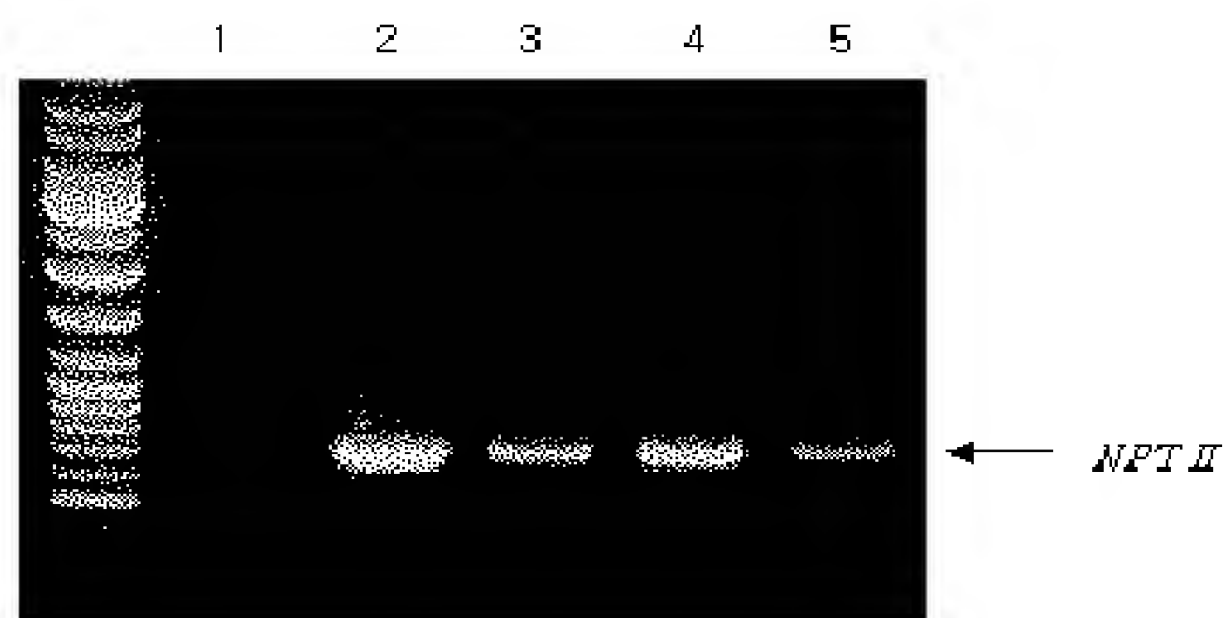
【도 6】



【도 7】



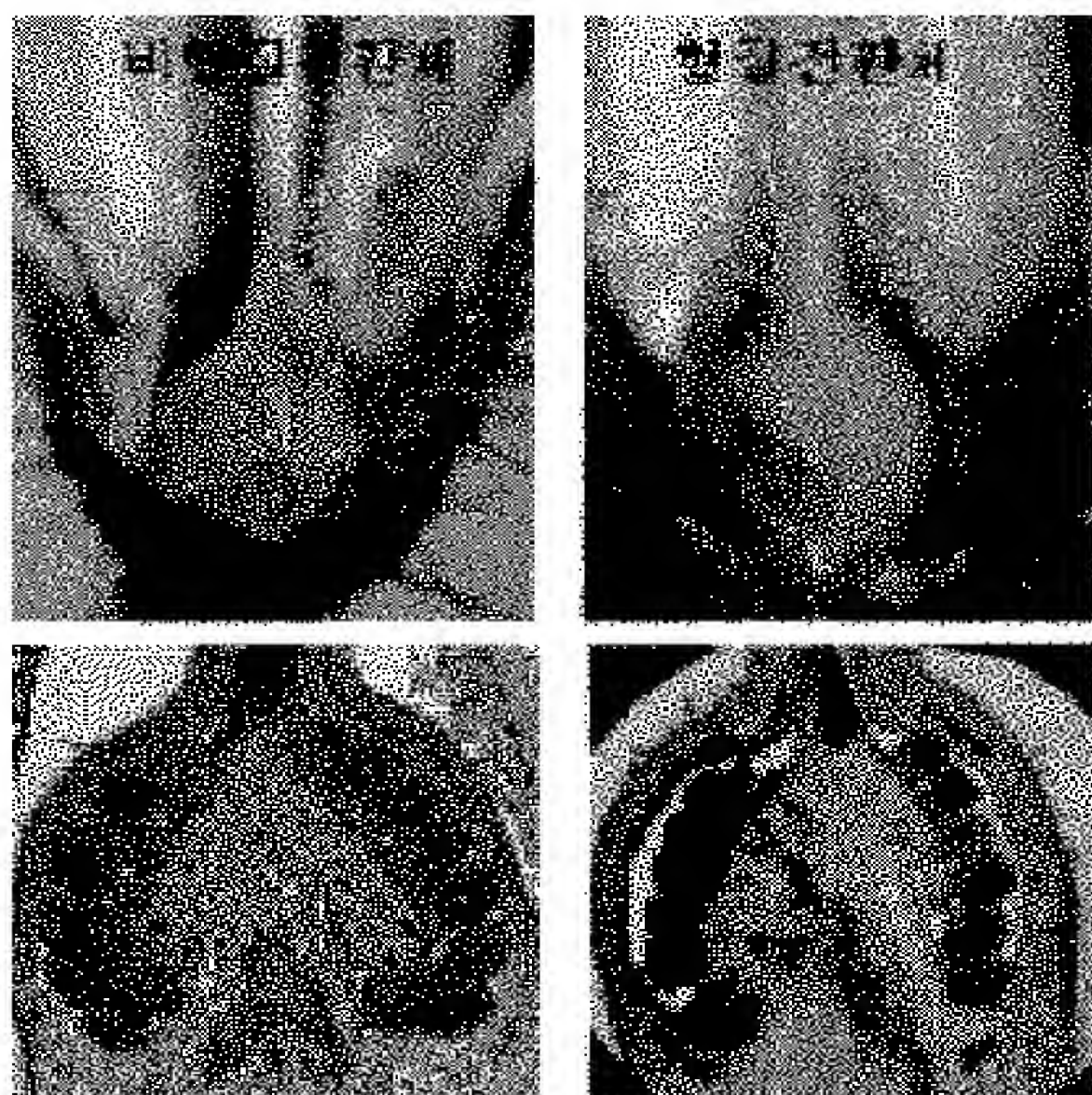
【도 8】



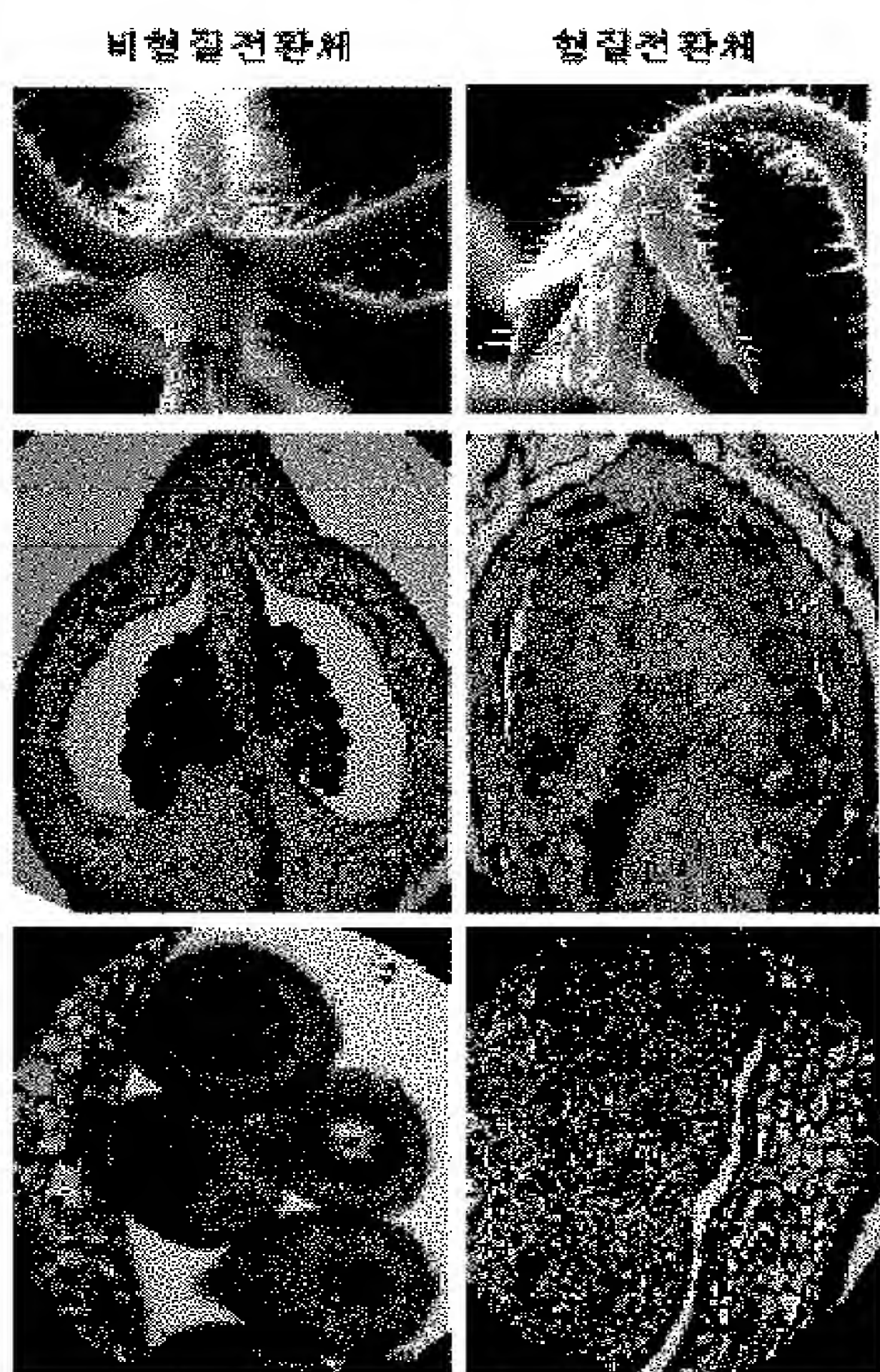
【도 9a】



【도 9b】



【도 9c】

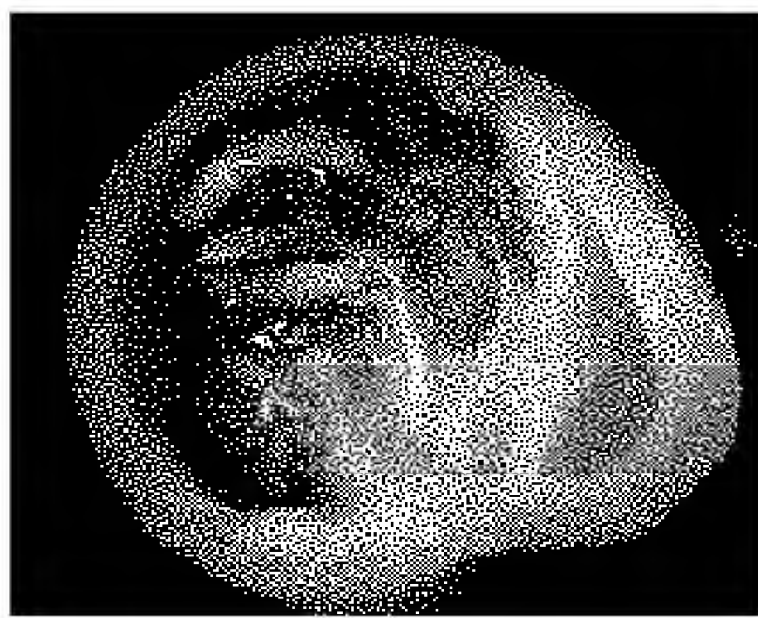
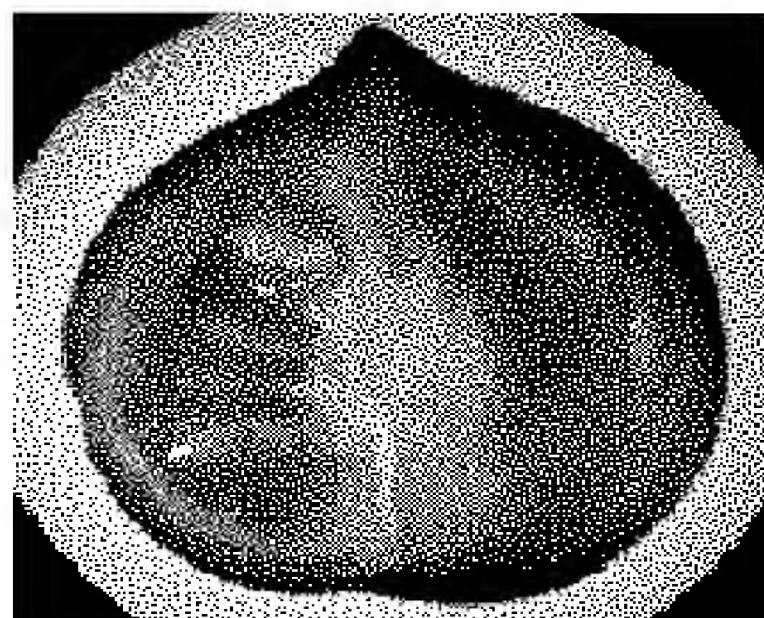


【도 10】

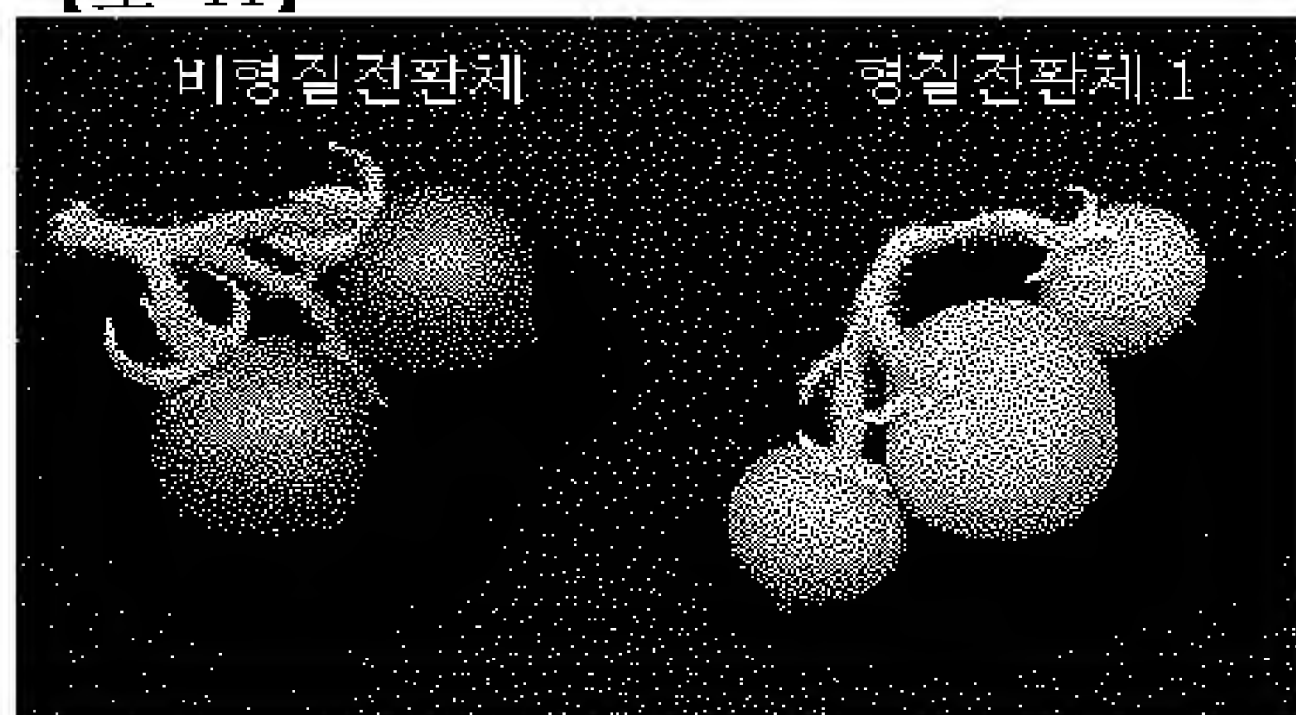


비형질전환체

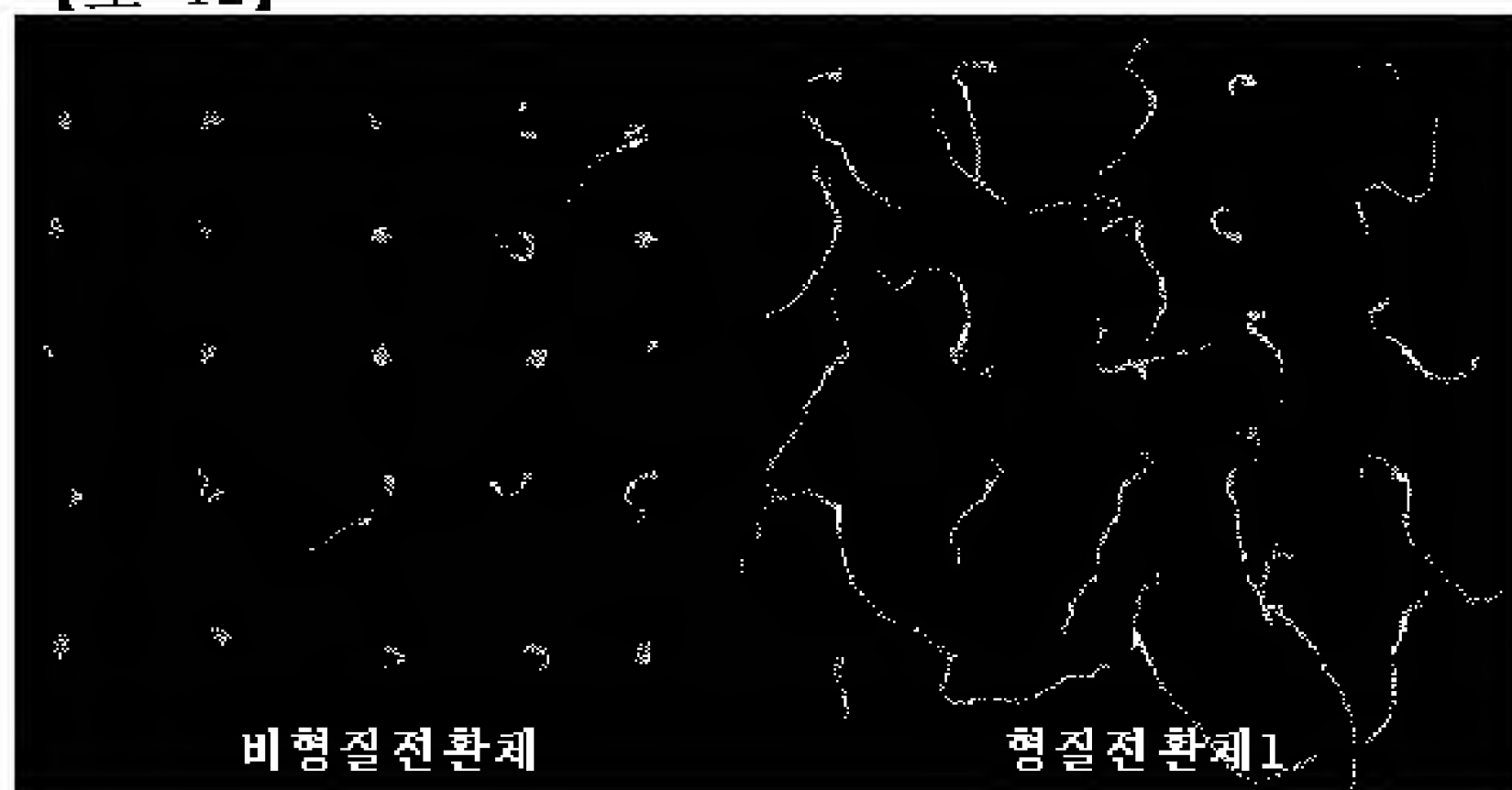
형질전환체 1



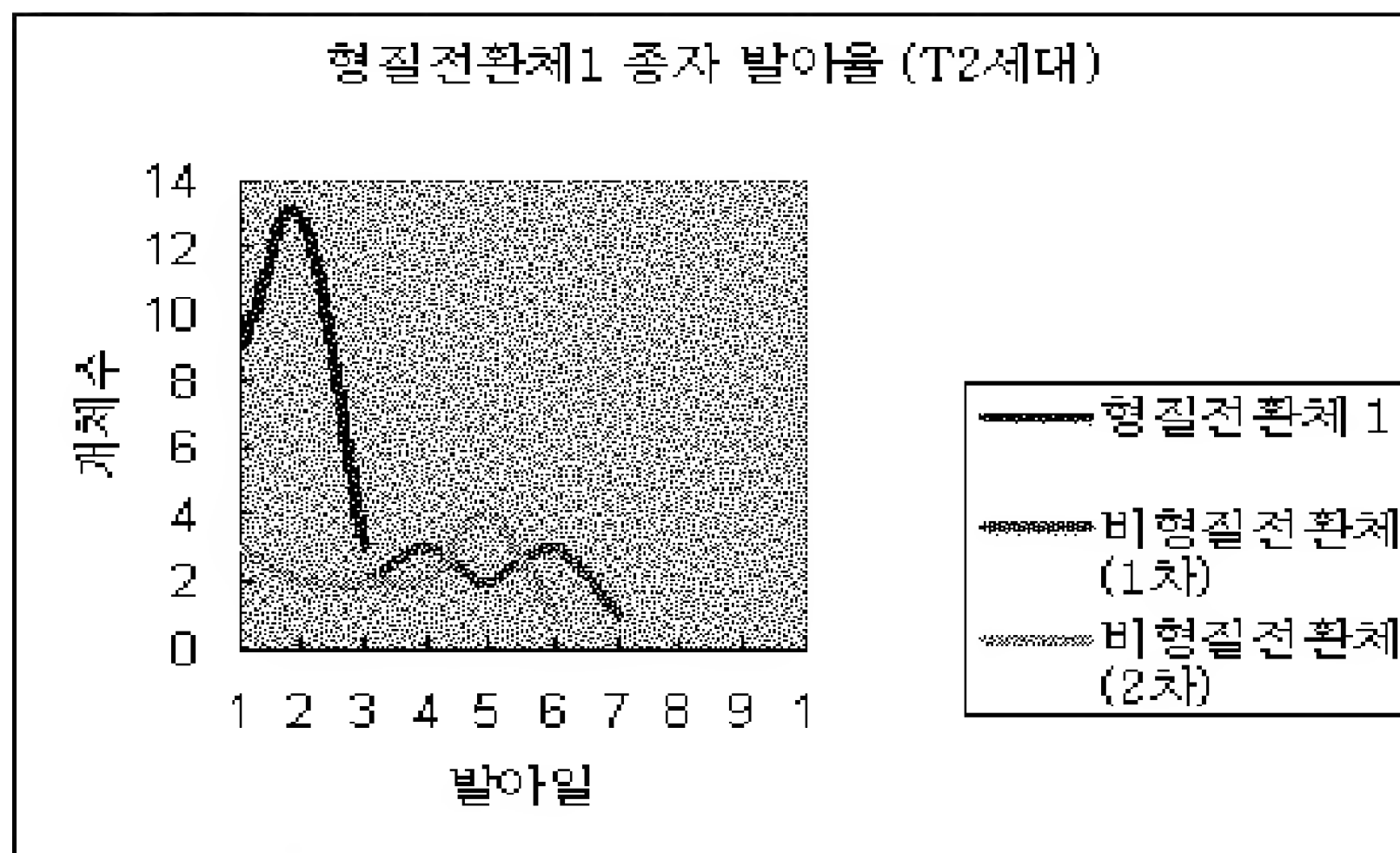
【도 11】



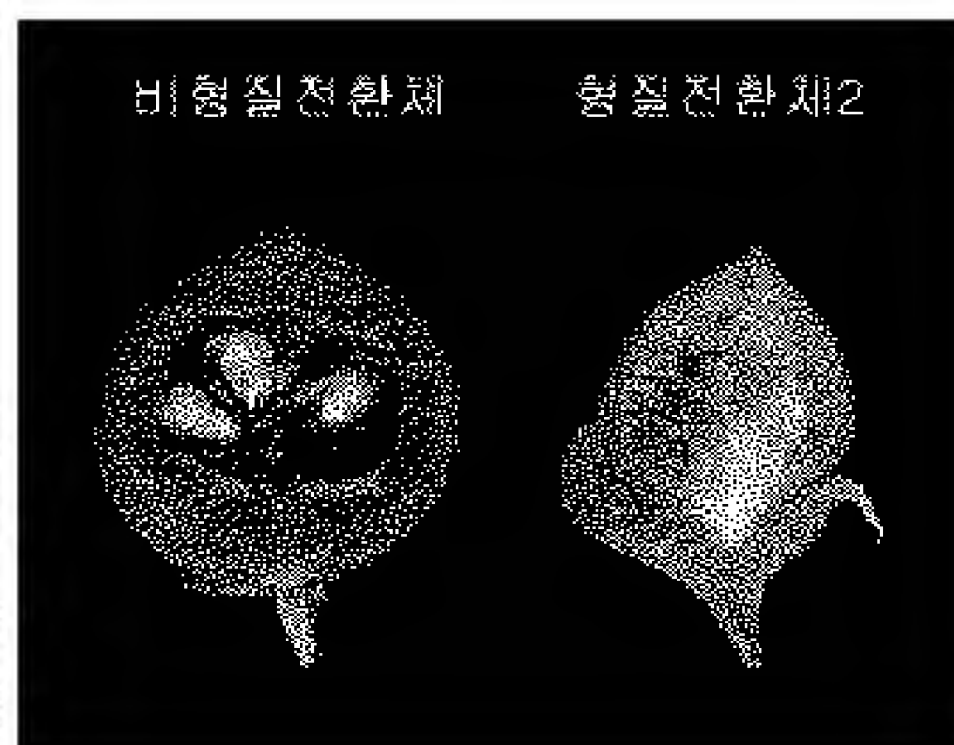
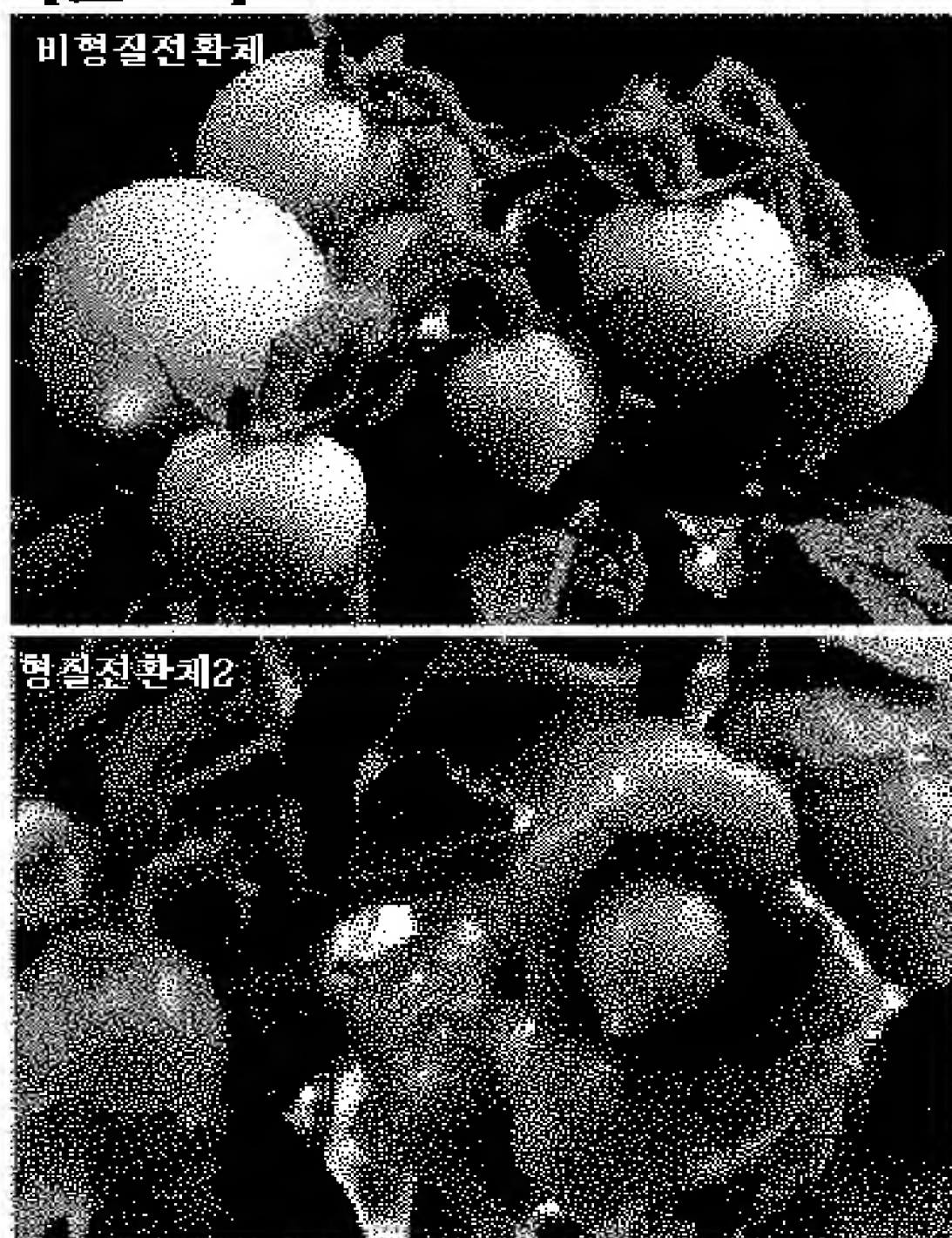
【도 12】



【도 13】



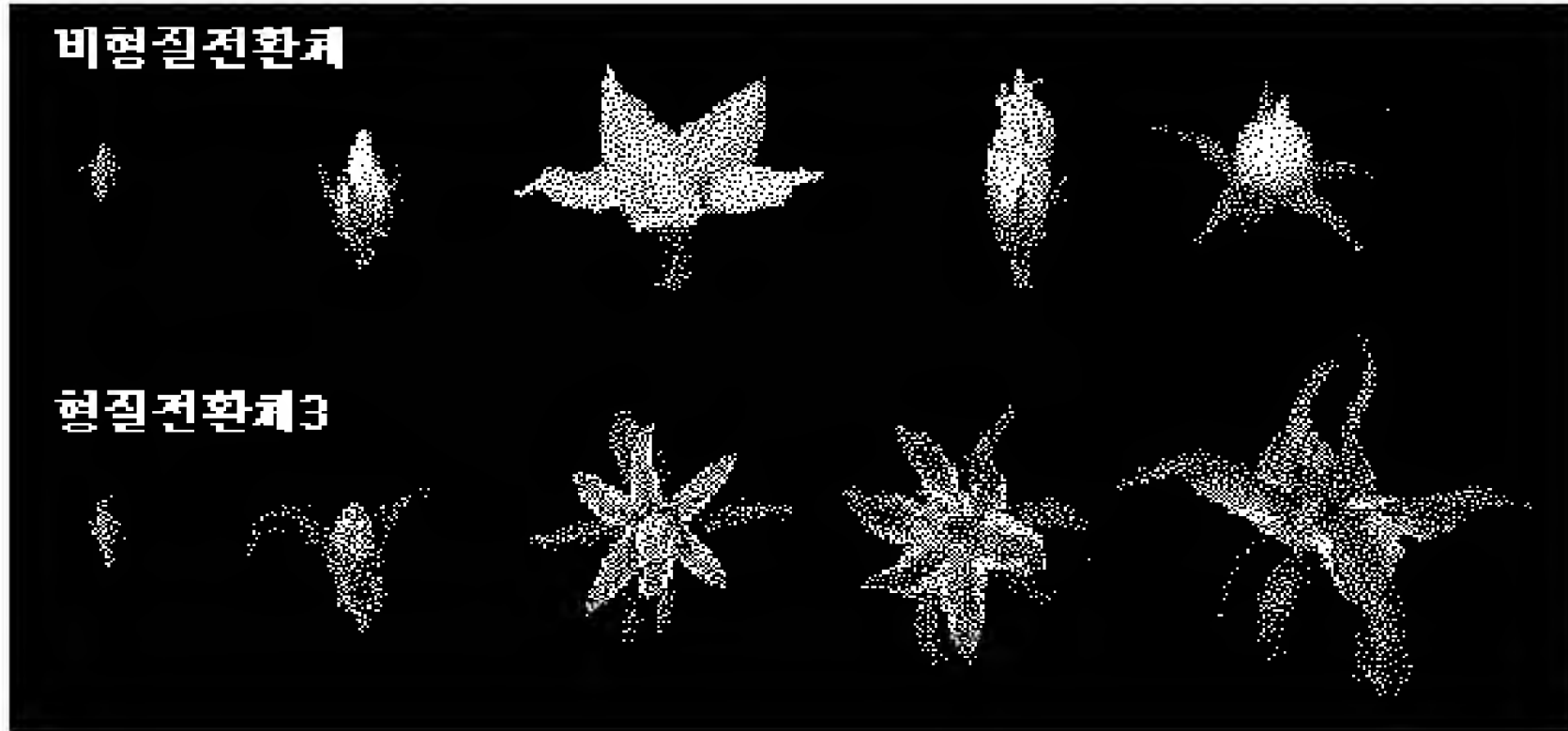
【도 14】



【도 15】

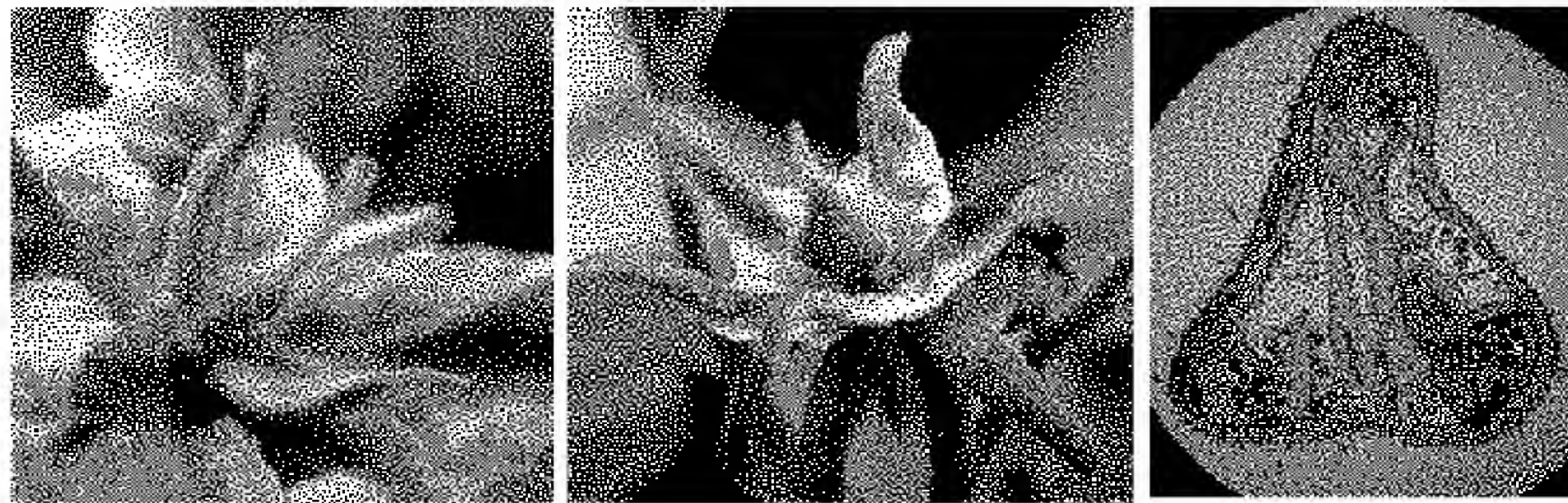
비형질전환체

형질전환체3



【도 16】

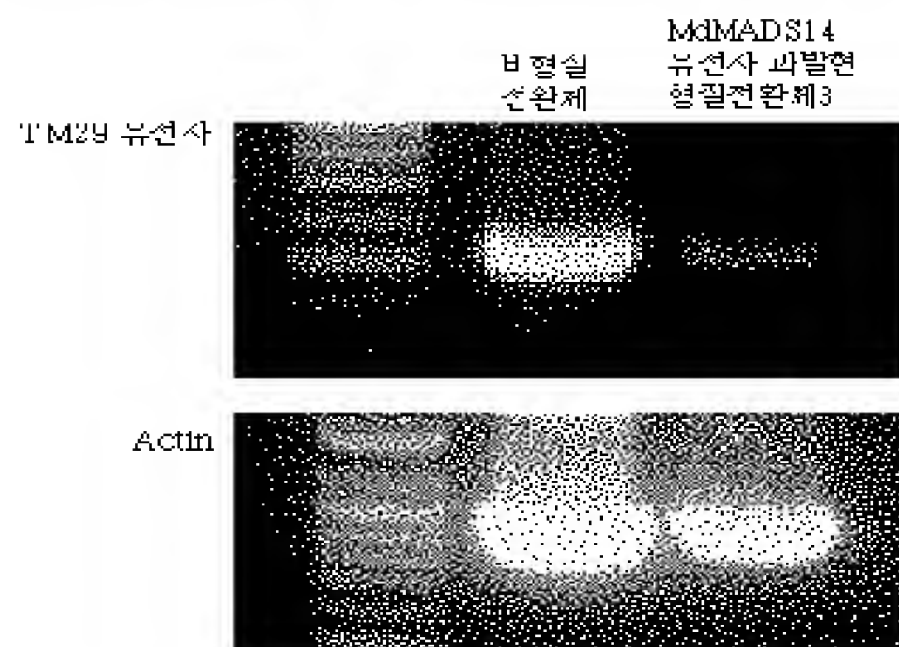
MdMADS14 유전자 과발현 형질전환체3



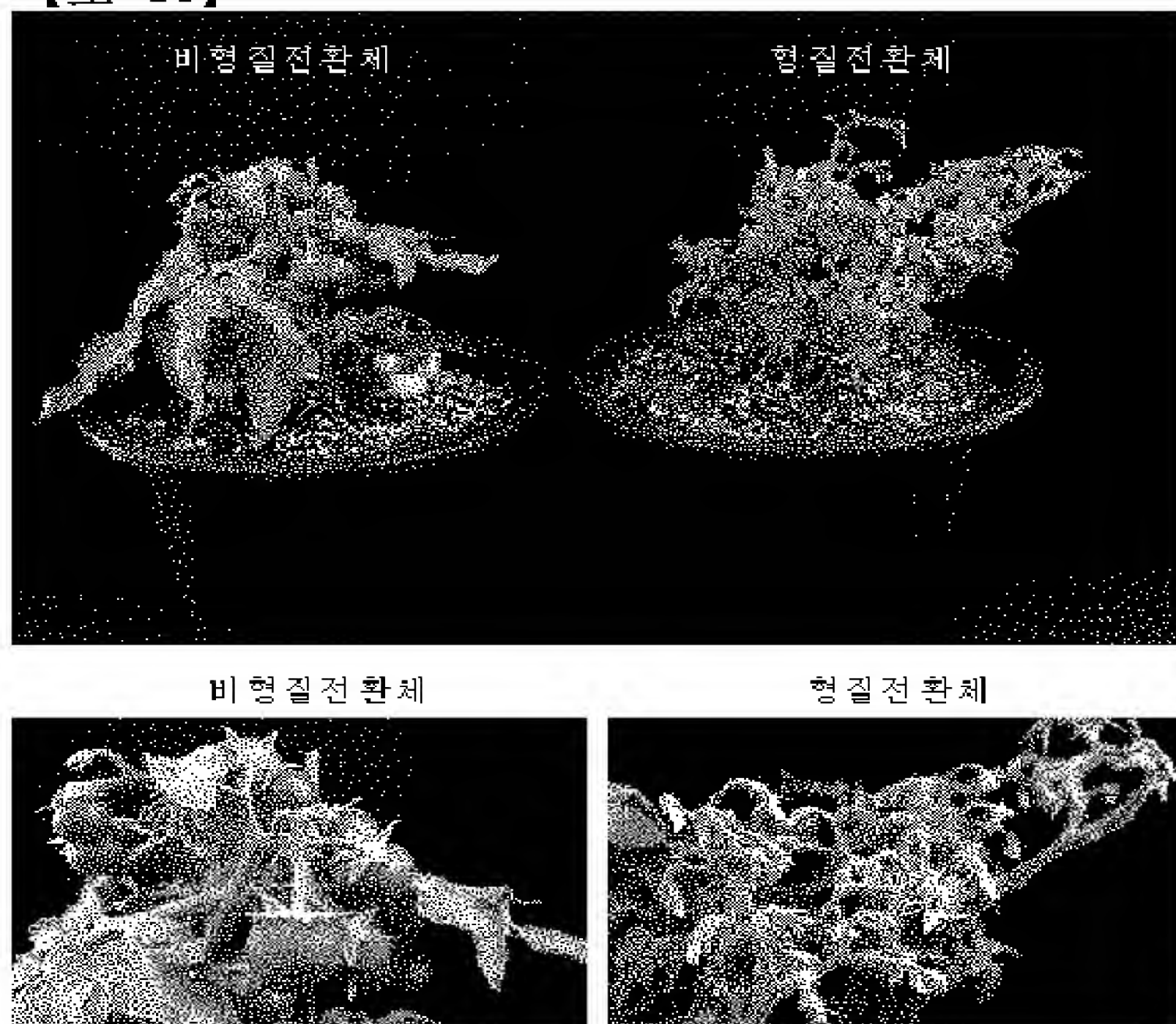
TM29 유전자 억제 형질전환체



【도 17】

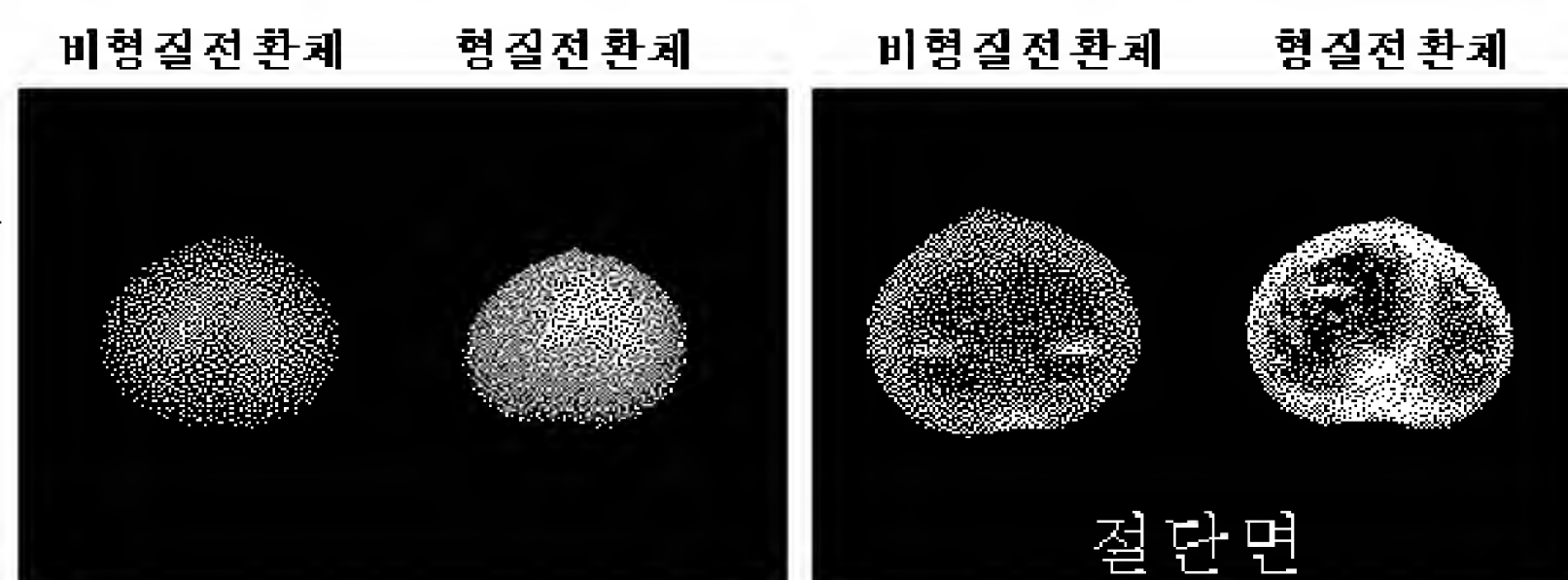


【도 18】

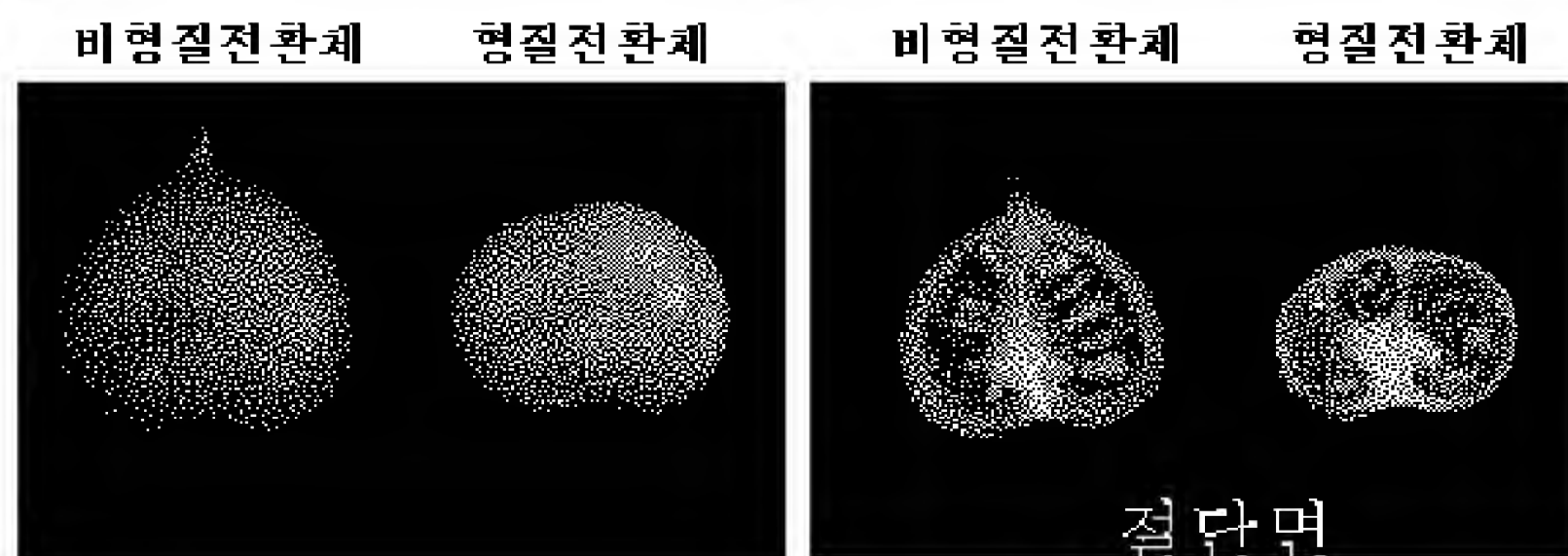


【도 19】

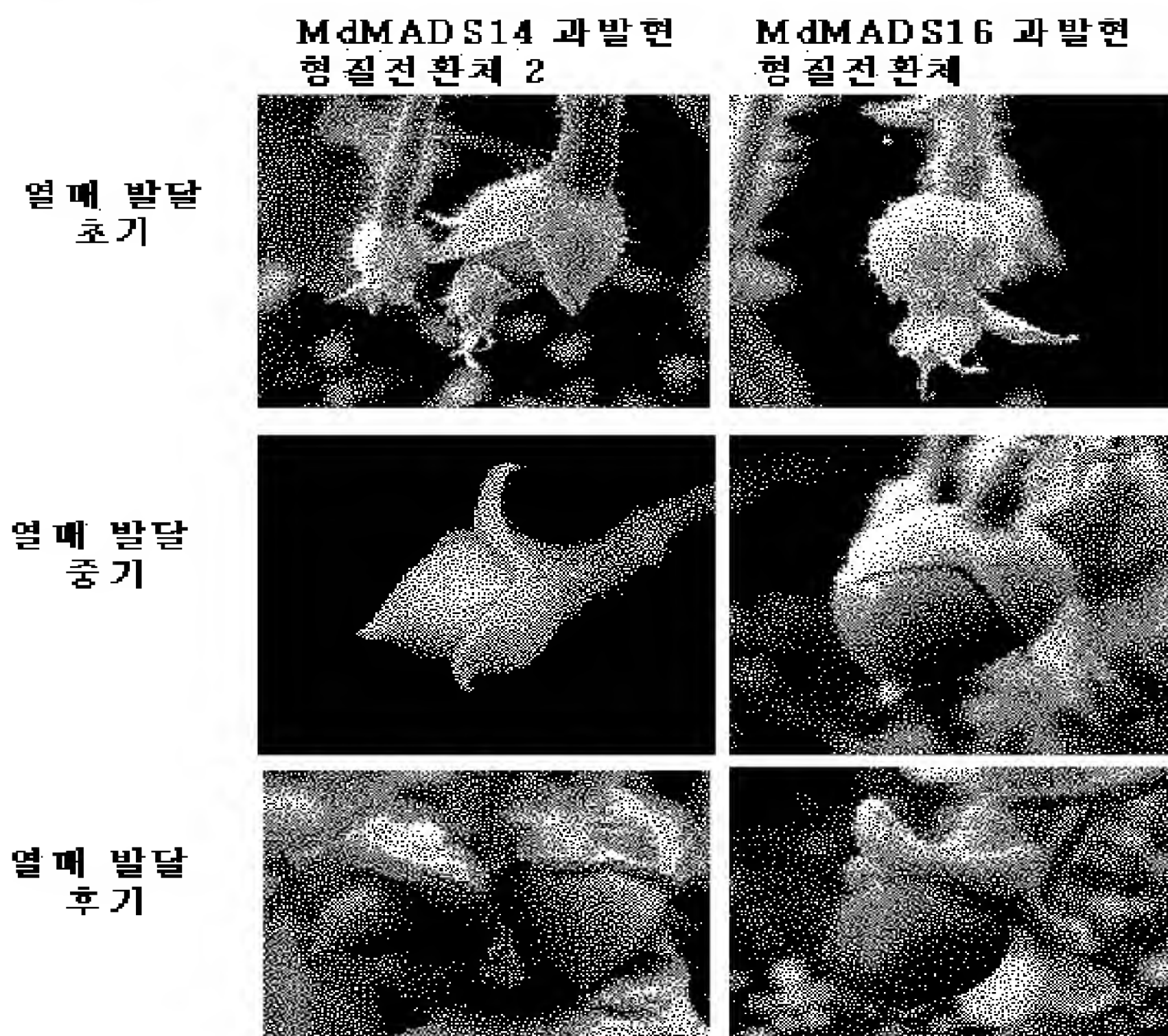
MdMADS14
과발현 형질전환체 1



MdMADS16
과발현 형질전환체



【도 20】



【서열목록】

<110> Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd. <120> Fruit and seed development regulating gene <130> 4p-02-37 <160> 20 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1065 <212> DNA <213> > Malus domestica <220> <221> gene <222> (1)..(1065) <223> Malus domestica mRNA for C-type MADS box protein(MdMADS14) <400> 1 acccacttcc cacttctgca attcttccctt ccggttgcca agtgcaaccc caaaagaaaa 60 actcaaagtc aagaactaac agaaagagcc acaattcatc tattttgagg ggttttttgcc 120 atttttcatc cttgtaacaa tggagttcgc aatcaagca cctgagagct ctacccaaaa 180 aaaattggga agaggcaaaa ttgagattaa gcggatcgaa aacactacca atcgacaagt 240 caccttctgc aaacgccgca acggattgct taagaaagcc tatgaattgt ctgttctttg 300 tgatgctgaa gttgctctta tcgtcttctc caccctgggc cgcctctatg agtatgctaa 360 caacagcgtt agagcaacaa tcgacaggta caaaaaagca tgcgctgatt ctacggacgg 420 tggatctgta tcagaagcta aactcagtt ttatcagcag gaagcatcaa aactgcgaag 480 acagatccga gaaattcaga attcaaacag gcatatactg ggggaatccc ttagcacctt 540 gaaagtcaag gaactgaaaa acctagaagg aagattggag aaaggaatca gcagaataag

```

600 atccaaaaag aatgaaatcc tgttttctga aatcgaattc atgcaaaaga gggagactga      660 gctgcaacac
cacaacaatt ttctgagagc aaagatagct gaaagcgaga gggaacagca      720 gcagcagcaa acacatatga
ttccgggaac ttctacgat ccgtcgatgc cttcgaattc      780 gtatgacagg aacttcttcc ctgtgatctt
ggagtccaat aataaccatt accctcgcca      840 aggccagaca gctctccaac ttgtttgaaa tgctggactg
ccgtctgatg ttcttctatc      900 catatcctct gatctgtctt cataaatcta tgagataatt gacgttgtag
tttttatgta      960 tatgggagaa ccagtttgct catgttctcc ataatatata tatgtgtgat gatggacccc
1020 aattctgtga taacatatat agtaaatttt attttctcac ccga      1065 <210>      2 <
211>      876 <212>      DNA <213>      Malus domestica <220> <221>      gene <222>      (1)..(876) <223>
Malus x domestica AGAMOUS-like protein mRNA, complete      cds(MdMADS16) <400>      2
gcaattcttc cttcccgttg ccaagtgcaa cccaataga aaaactcaaa gtcaagaact      60 agctaacaga
gaaaaccaca attcatcaat ttggaggggt ttttgccatt tttcatcctt      120 gcaacaatgg agttcccaaa
tcaagcaccg gagagctcct ccagaaaaaa attgggaagg      180 ggcaaaattg agattaagcg gatcgaaaac
actacaaatc gacaagttac cttctgcaaa      240 cgccgcaacg gattgcttaa gaaagcctat gaattgtctg
ttctttgtga tgctgaagtt      300 gctcttatcg tgttctccaa ccgtggccgc ctctatgagt atgctaacaa
cagtgttaga      360 gcaacaatcg acaggtacaa aaaagcatac gctgataccta cgaacagtgg atctgtttca
420 gaagccaaca ctgagtttta tcagcaggaa gcatccaaac tgcaagaca gatccgagaa      480 attcagaatt
caaacaggca tatactgggt gaagctctta gtccttgaa cgccaaggaa      540 ctgaagaacc tagaaggaag
attggagaaa ggaatcagca gaataagatc caaaaagaat      600 gaaatgctgt tttctgaaat cgaattcatg
caaaaaaggg agaccgagct gcaacaccac      660 aacaattttc tgagagcaaa gatagctgaa aacgagaggg
aagagcagca gcatacacac      720 atgatgccgg gaacttctta cgatcagtca atgccttcgc attcttatga
caggaacttc      780 ctcccagcgg tgatcttgga gtccaacaat aaccattacc ctaccaagt ccagacagct
840 ctccaacttg ttgaaatgc tggactgcgc tctgat      876 <210>      3
<211>      20 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <223>      first forward degenerate
primer <220> <221>      misc_feature <222>      (1)..(20) <223>      6th, 12th, 15th nucleotide 'n'
represent inosine <400>      3 aaycgnccarg tnacnttytg

```


20 <210> 4 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> first reverse
 degenerate primer <220> <221> misc_feature <222> (1)..(19) <223> 3th, 12th and 15th
 nucleotide 'n' represent inosine <400> 4 tcngcgatyt tnshnckna

19 <210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> second
 forward degenerate primer <220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> 9th and 18th
 nucleotide 'n' represent inosine <400> 5 aaraargcnt aygarytntc

20 <210> 6 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> third forward
 primer <400> 6 tctagaacta gtggatcccc cgggctgcag gaattc 36

<210> 7 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> third reverse
 primer <400> 7 atccactgtt cgtaggatca gcgtatg 27

<210> 8 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forth forward
 primer <400> 8 ggctgcagga attcggcact aggcaatt 28

<210> 9 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forth reverse
 primer <400> 9 gcaagcttat cagacggcag tccagc 26

<210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MdMADS14
 forward primer <400> 10 gggaacagca gcagcagcaa a

21 <210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MdMADS14
 reverse primer <400> 11 ctccaagatc acaggaaga a

21 <210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MdMADS16
 forward primer <400> 12 tgaaaacgag agggaagagc a

21 <210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> MdMADS16
 reverse primer <400> 13 caagatcacc gctgggagga a

21 <210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> ACTIN
 forward primer <400> 14 cgatggccaa gtcatacaaa t

21 <210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> ACTIN

reverse primer <400> 15 tctcatgaat gccagcagct t

21 <210> 16 <211> 249 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

hybridization probe <400> 16 atgcaaaaaa gggagaccga gctgcaaac cacaacaatt ttctgagagc
aaagatagct 60 gaaaacgaga gggaagagca gcagcatata cacatgatgc cgggaacttc ctacgatcag
120 tcaatgcctt cgcattctta tgacaggaac ttcttcccag cggatgatctt ggagtccaac 180 aataaccatt
accctcacca agtccagaca gctctccaac ttgtttgaaa tgctggactg 240 ccgtctgat

249 <210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> NPT II

forward primer <400> 17 gaggctattc ggctatgact g

21 <210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> NPT II

reverse primer <400> 18 atcgggagcg gcgataccgt a

21 <210> 19 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> TM29 forward
primer <400> 19 gatgctgaag ttgctctact cg 22

<210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> TM29 reverse
primer <400> 20 ctctagaggt tggaagaaac cc 22